



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS



DAVIDSON BARBOSA ASSIS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS MECANISMOS
ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO
2-ALILFENOL.

JOÃO PESSOA – PB

2022

DAVIDSON BARBOSA ASSIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS MECANISMOS
ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO
2-ALILFENOL.**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Desenvolvimento e Inovação
Tecnológica em Medicamentos do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba, para
obtenção do título de DOUTOR EM
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM
MEDICAMENTOS.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

JOÃO PESSOA – PB

2022

DAVIDSON BARBOSA ASSIS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO 2-ALILFENOL.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de DOUTOR EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS.

Aprovado em: 04 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:



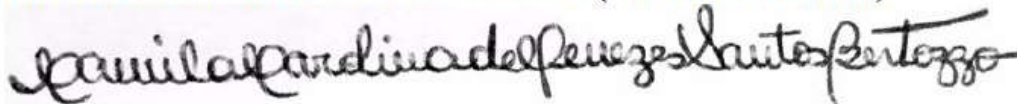
Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (presidente)



Prof.ª Dr.ª Maria De Fatima Vanderlei De Souza (Examinadora Interna)



Prof. Dr. Walter Mendes de Oliveira Júnior (Examinador Interno)



Prof.ª Dr.ª Camila Carolina de Menezes Santos Bertozzo (Examinadora Externa)



Prof.ª Dr.ª Maria Denise Leite Ferreira (Examinadora Externa)

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A848a Assis, Davidson Barbosa.

Avaliação da atividade antioxidante e dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do 2-alilfenol / Davidson Barbosa Assis. - João Pessoa, 2022.
103 f. : il.

Orientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.
Tese (Doutorado) - UFPB/IPeFarM.

1. Medicamento. 2. 2-alilfenol. 3. Fenilpropanoide.
4. Dor. 5. Inflamação. 6. Anti-oxidante. I. Almeida, Reinaldo Nóbrega de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615.2(043)

Aos meus pais, Francisco e Severina, pelos seus
exemplos em vida e por sempre me mostrar aquilo
que realmente importava: o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças e me ajudado a perseverar em todos os momentos difíceis.

Ao meus pais e aos meus irmãos por sempre me incentivarem a buscar os meus sonhos, bem como me guiar durante as horas de dúvidas e dificuldades, e por sempre acreditarem em mim e no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida, por sua bondade, confiança e disponibilidade e por ter em mim depositado seu tempo ao me tornar seu orientando e destarte abrir as portas da pós-graduação. Ao senhor, exemplo ímpar de professor, pesquisador e ser iluminado: o meu mais sincero obrigado.

Ao meu amigo Renan Marinho Braga, que no decorrer dessa jornada, foi o primeiro a me incentivar, orientar, criticar, ensinar, enfim; por ser a luz a guiar meus caminhos, ele foi de fato meu co-orientador, aquele ombro amigo a acalmar e me dar forças a continuar mesmo quando o pensamento e a vontade fraquejavam. Sem você grande amigo, esse sonho não seria possível, à você meu mais sincero, MUITO OBRIGADO!

Aos professores da pós-graduação, em especial ao professor Marcus Tullius Scotti e sua equipe pela estimada parceria e contribuição nos estudos de *Docking* molecular. E ao professor Arthur Antunes Jacome Vidal da UFRN pela sua enorme contribuição nos estudos de atividade antioxidantes.

A todos os colegas de bancada e da turma do doutorado, em especial Humberto Hugo, Humberto Neto, Poliane, Álefe, e Aline Kely, pela participação direta e indireta no meu aprendizado e por serem companheiros nessa jornada.

Aos estudantes de iniciação científica, por sua presteza em me ajudar e de sua disponibilidade para realizar os experimentos e serem parceiros de bancada.

Aos funcionários do Biotério Prof. Dr. Thomas George por todos os serviços prestados.

Aos membros da banca Dr. Walter Mendes, Dra Fatima Wanderley, Dra Camila Carolina, Dra Maria Denise, Dra Rita de Cássia e Dra Patrícia Trindade, por terem aceito de forma tão carinhosa meu convite para comporem minha banca, bem como pela contribuição no aprimoramento da versão final deste trabalho.

À Adriana, secretária da Pós-graduação, pela atenção, dedicação e serviços prestados com excelência.

À Unidade de Produção Animal – IPeFarM

À Universidade Federal da Paraíba e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio estrutural e financeiro.

A todos que de alguma forma participaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho. Muito obrigado!

“Aliviar a dor é obra divina”

(Hipócrates)

RESUMO

ASSIS, D.B. **Avaliação da atividade antioxidante e dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do 2-alilfenol.** 2022. 103p. **Tese** (Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – UFPB / CCS, João Pessoa.

O 2-alilfenol (2-AF) é um fenilpropanoide amplamente comercializado na China sob o nome de Yinguo. Extraído do exosperma da fruta *Ginkgo biloba*, o 2-AF apresenta atividade antibacteriana, antitumoral, antifúngica e antinociceptiva já relatadas. Entretanto é necessário elucidar com mais detalhes o mecanismo pelo qual o 2-AF promove seu efeito antinociceptivo por metodologias *in silico*, *in vivo* e *in vitro*. O 2-AF foi adquirido da SIGMA (St. Louis, MO, EUA) e sua administração foi realizada nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg (i.p.) sempre trinta minutos antes da realização dos testes farmacológicos. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB -, sob a certidão de nº 4443051018. Os experimentos iniciaram com a investigação do mecanismo antinociceptivo do 2-AF. Para estudar a participação dos sistemas nitroxidérgico, GABAérgico e dopaminérgico administrou-se respectivamente L-NNA, flumazenil e sulpirida quinze minutos antes do tratamento com o 2-AF no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. No intuito de aumentar as evidências da atuação do 2-AF na via adenosinérgica, anteriormente relatada, foi realizado um estudo de docking molecular. O teste da peritonite induzida por carragenina foi utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório do 2-AF através da avaliação da migração celular e dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no líquido peritoneal. Por fim, a atividade antioxidante do 2-alilfenol foi determinada pelos testes da capacidade antioxidante total, atividade sequestradora de DPPH, teste da atividade sequestradora do radical hidroxila, teste da atividade sequestradora de superóxido. O tratamento com o L-NNA, flumazenil e sulpirida não reverteram o efeito antinociceptivo do 2-AF, descartando a participação dos sistemas nitroxidérgico, GABAérgico e dopaminérgico no efeito antinociceptivo. Os estudos de docking confirmaram afinidade entre o 2-AF e o receptor A2a, essa interação pode estar relacionada à redução da produção de citocinas pró-inflamatórias. Nos testes anti-inflamatórios, o 2-AF inibiu a migração de leucócitos via redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β no teste da peritonite. Apresentou uma alta capacidade antioxidante total sendo esta atividade proporcionada através do sequestro de radicais superóxido, demonstrando que sua atividade antioxidante também pode estar auxiliando no efeito anti-inflamatório e antinociceptivo. Diante dos resultados, torna-se evidente o potencial clínico do 2-AF para o tratamento da dor e inflamação.

Palavras-chave: 2-alilfenol; fenilpropanoide; dor; inflamação; anti-oxidante

ABSTRACT

ASSIS, D.B. **Evaluation of antioxidant activity and mechanisms involved in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of 2-allylphenol.** 2022. 103p. **Tese** (Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – UFPB / CCS, João Pessoa.

2-Allylphenol (2-AP) is a phenylpropanoid widely marketed in China under the name Yinguo. Extracted from the exosperm of the Ginkgo biloba fruit, 2-AP has previously reported antibacterial, antitumor, antifungal and antinociceptive activities. However, it is necessary to elucidate in more detail the mechanism by which 2-AP promotes its antinociceptive effect, by *in silico*, *in vivo* and *in vitro* methodologies. 2-AP was purchased from SIGMA (St. Louis, MO, USA) and administration was carried out at doses of 50, 75 and 100 mg/kg (i.p.) always thirty minutes before the performance of pharmacological tests. All experimental procedures were previously approved by the CEUA - UFPB's Committee on Ethics in the Use of Animals -, under certificate no. 4443051018. The experiments started with the investigation of the antinociceptive mechanism of 2-AP. To study the participation of the nitroxidergic, GABAergic and dopaminergic systems, respectively, L-NNA, flumazenil and sulpiride were administered fifteen minutes before the treatment with 2-AP in the test of abdominal writhing induced by acetic acid. In order to increase the evidence of the action of 2-AP in the adenosinergic pathway, previously reported, a study of molecular docking was carried out. The carrageenan-induced peritonitis test was used to assess the anti-inflammatory effect of 2-AP by evaluating cell migration and levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in peritoneal fluid. Finally, the antioxidant activity of 2-AP was determined by tests of total antioxidant capacity, DPPH scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity test, superoxide scavenging activity test. Treatment with L-NNA, flumazenil and sulpiride did not reverse the antinociceptive effect of 2-AP, ruling out the participation of the nitroxidergic, GABAergic and dopaminergic systems in the antinociceptive effect. Docking studies confirmed an affinity between 2-AP and the A2a receptor, this interaction may be related to the reduction in the production of pro-inflammatory cytokines. In anti-inflammatory tests, 2-AP inhibited leukocyte migration via reduced levels of TNF- α and IL-1 β in the peritonitis test. It presented a high total antioxidant capacity, this activity being provided through the scavenging of superoxide radicals, demonstrating that its antioxidant activity may also be helping in the anti-inflammatory and antinociceptive effect. In view of the results, the clinical potential of 2-AP for the treatment of pain and inflammation becomes evident.

Keywords: 2-allylphenol; phenylpropanoid; pain; inflammation; antioxidant

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via nociceptiva ascendente.....	25
Figura 2: Estrutura química do 2-AF.....	38
Figura 3: Desenho Experimental.....	45
Figura 4: Sequestro de radical DPPH por compostos antioxidantes.....	50
Figura 5: Sequestro de radical superóxido por compostos antioxidantes.....	51
Figura 6: Redução do molibdênio (Mo ⁺⁶) a molibdênio (Mo ⁺⁵).....	52
Figura 7: Efeito da L-nitroarginina (L-NNA, 100 mg/kg, i.p.), flumazenil (FLU, 20 mg/kg, i.p.) e sulpirida (SULP, 20 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (2-AF, 75 mg/kg, i.p.) no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	55
Figura 8: Interações de ligação de hidrogênio para (a) adenosina, (b) 2-AF e (c) 2-AF (sem molde) (PDB ID 2YDO). As linhas tracejadas azuis representam as interações da ligação de hidrogênio; linhas tracejadas marrons representam confrontos estéricos.....	56
Figura 9: Melhores resultados de docking para adenosina (a) e 2-AF (b) no sítio ativo A2a. As linhas tracejadas azuis representam as interações da ligação de hidrogênio; linhas tracejadas marrons representam confrontos estéricos. (c) Conformações de ligação para 2-AF no sítio ativo do receptor de adenosina A2a (PDB ID 2YDO). A superfície azul representa áreas hidrofóbicas favoráveis; a superfície vermelha representa áreas hidrofílicas favoráveis.....	57
Figura 10: Interações de ligação de hidrogênio para (a) UKA, (b) 2-AF (PDB ID 3QAK). As linhas tracejadas azuis representam as interações da ligação de hidrogênio; linhas tracejadas marrons representam confrontos estéricos.....	58
Figura 11: Melhores resultados de docking para UKA (a) e 2-AF (b) no sítio ativo A2a (PDB ID 3QAK). As linhas tracejadas azuis representam as interações da ligação de hidrogênio; linhas tracejadas marrons representam confrontos estéricos.....	58

Figura 12: Campos moleculares 3D grid do 2-AF com sonda DRY. Os contornos verdes são regiões hidrofóbicas mostradas em -1.0 kcal mol ⁻¹ ; contornos azuis são regiões hidrofílicas a -2.0 kcal mol ⁻¹	59
Figura 13: Efeito do 2-alilfenol (2-AF, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e dexametasona (DEXA, 2 mg/kg, s.c.) sobre a migração leucocitária total no teste da peritonite induzida pela carragenina.....	60
Figura 14A e 14B: Efeito do 2-alilfenol (2-AF, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e dexametasona (DEXA, 2 mg/kg, s.c.) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β 4h após a administração de carragenina.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ferramentas farmacológicas utilizadas para o estudo das vias de sinalização envolvidas na possível antinocicepção mediada pelo 2-alilfenol.....	46
Tabela 2: Atividade sequestradora de radical DPPH do 2-AF (0,25; 0,5; 1; 2 e 5 mg/mL).....	62
Tabela 3: Atividade sequestradora de radical hidroxila do 2-AF (0,25; 0,5; 1; 1,5 e 2 mg/mL) e do ácido gálico (0,5 mg/mL).....	63
Tabela 4: Atividade sequestradora de radical superóxido do 2-AF (0,1; 0,25 e 0.5 mg/mL) e do ácido gálico (0,5 mg/mL).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
% SRL	Porcentagem de sequestro de radicais livres
(MVD	Molegro Virtual Docker
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
•NO	Radical óxido nítrico
•NO ₂	Radical dióxido de nitrogênio
•OH	Radical hidroxila
1O ₂	Oxigênio singlete
2-AF	2-alilfenol

2YDO	Estrutura cristalográfica da adenosina
3D	Estruturas tridimensionais
Aam	Absorbância das amostras
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico)
Ac	Absorbância do controle
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância "one-way"
Asn	Asparagina
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigena
DEXA	Dexametasona
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil
DRY	Sonda hidrofóbica
e.p.m	Erro padrão da média
EAA/g	Equivalente de ácido ascórbico
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
Fe ²⁺	Íon ferroso
FeSO ₄	Sulfato ferroso
FLU	Flumazenil
g	Gramas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GRD	Gânglio da raiz dorsal
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HClO	Ácido hipocloroso
His	Histidina
HO ₂ •	Radical hidroperoxila
i.p.	Intraperitoneal
IA	Inteligência artificial
IASP	Associação Internacional de Estudos para Dor
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IPeFarM	Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos
K ⁺	Íon potássio
Kg	Kilogramas
LOOH	Peróxidos lipídicos
Ltda	Sociedade Limitada

M	Molar
MDA	Malonaldeído
mg	Miligramas
MIF	Campos de interação molecular
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Mo	Molibdênio
MO	Missouri
N1	Sonda doadora de ligação amida nitrogênio-hidrogênio
NADPH	Dinucleotídeo fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
nm	Nanometros
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
O	Sonda aceptora de ligação carbonil oxigênio-hidrogênio
O2	Gás oxigênio
O2-•	Radical ânion superóxido
O3	Ozônio
oC	Graus célcios
OH2	Sonda de água
ONOO-	Peroxinitrito
p	Probabilidade de significância
P2X3	Purinoceptor 3 de P2X
PBS	Solução Tampão Fosfato-Salino
PDB	Protein Data Bank
pg	Picogramas
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
r.p.m.	Rotações por minuto
rACC	Córtex cingulado anterior rostral
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico menssageiro
RO•/LO•	Radical alcoxila
ROO•/LOO•	Radical peroxila
RVM	Medula ventromedial rostral
s	Segundos
s.c.	Subcutâneo
SCPD	Substância cinzenta periaquedutal
Ser	Serina
SNC	Sistema Nervoso Central

SOD	Superóxido dismutase
SP	Substância P
SULP	Sulpirida
TBA	Ácido tiobarbitúrico
Thr	Treonina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TrKA	Receptor de tropomiosina quinase A
TRP	Receptores de potencial transiente
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UKA	Agonista Sintético do Receptor A2a
UPA	Unidade de produção animal
UV	Ultravioleta
v/v	Porcentagem em volume
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar

OBS.: As abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1. Dor	21
2.1.1. Fisiopatologia	22
2.2. Estresse Oxidativo	27
2.2.1. ERO/ERN	27
2.2.2. Antioxidantes	28
2.2.3. Dor, Inflamação e Estresse Oxidativo	29
2.3. Limitações na terapia farmacológica da dor	30
2.4. Modelos animais para avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de substâncias	32
2.5. <i>Docking</i> molecular	33
2.6. Produtos naturais como alternativa para o tratamento da dor	35
2.6.1. Óleos Essenciais	36
2.6.2. Fenilpropanoides	36
2.6.3. 2-Alilfenol (2-AF)	37
3. OBJETIVO	41
3.1. Objetivo Geral	41
3.2. Objetivos Específicos	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Animais	43
4.2. Substância teste	43
4.3. Substâncias Utilizadas	43
4.4. Condições experimentais	44
4.5. Avaliação do mecanismo de ação antinociceptiva	45
4.5.1. Participação das vias Nitroxidérgica, Gabaérgica e Dopaminérgica no efeito antinociceptivo do 2-AF	45
4.6. Estudo de <i>Docking</i> Molecular	47
4.6.1. Interações na superfície molecular	47
4.7. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória	48
4.7.1. Peritonite induzida pela carragenina	48
4.7.2. Dosagem de TNF- α e IL-1 β no líquido peritoneal	48
4.8. Avaliação da atividade antioxidante	49

4.8.1. Radical Hidroxila ($\bullet\text{OH}$).....	49
4.8.2. Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH $\bullet$)	49
4.8.3. Radical Ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	50
4.8.4. Capacidade Antioxidante Total (CAT).....	51
4.9. Eutanásia	52
4.10. Análise estatística	53
5. RESULTADOS	55
5.1 Avaliação do mecanismo de ação antinociceptiva	55
5.1.1. Participação das vias Nitroxidérgica, Gabaérgica e Dopaminérgica no efeito antinociceptivo do 2-AF	55
5.2. Análise do 2-AF em estudos de <i>docking</i>	56
5.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória	59
5.3.1. Efeito do 2-AF no teste da Peritonite Induzida pela carragenina	59
5.3.2. Efeito do 2-AF sobre as citocinas TNF- α and IL-1 β	60
5.4. Avaliação da atividade antioxidante	62
5.4.1. Efeito do 2-alilfenol na atividade sequestradora do radical DPPH	62
5.4.2. Efeito do 2-alilfenol na atividade sequestradora do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) .	62
5.4.3. Efeito do 2-alilfenol na atividade sequestradora do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	63
5.4.4. Capacidade Antioxidante Total (CAT) do 2-alilfenol	64
6. DISCUSSÃO	66
8. PERSPECTIVAS	78
REFERÊNCIAS	80
ANEXOS	101

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A dor desempenha papéis fisiológicos importantes, alertando o organismo para a presença de estímulos danosos (WHITE; BHANGOO; MILLER, 2005). O componente fisiológico da dor é a nocicepção, que é a identificação de um estímulo térmico, mecânico ou químico por transdutores especializados ligados a fibras dos nervos periféricos, as quais transmitem sinais ao sistema nervoso central (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

A dor pode ser classificada quanto às características fisiopatológicas (dor inflamatória e dor neuropática) ou quanto ao tempo de duração; dor aguda (curta duração) ou dor crônica (longa duração) (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). A dor pode ser persistente e incapacitante, se tornando um incômodo na vida dos pacientes, sendo uma das principais causa que leva a procura dos serviços de saúde (LE MOS, 2017; CORREIA, 2021).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) estão implicadas em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo inflamação e dor (SALVEMINI; DOYLE; CUZZOCREA, 2006). A produção de EROs/ERNs e a sua alta reatividade química com biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA, pode causar algumas alterações danosas, como a destruição das membranas celulares por peroxidação lipídica, bem como a desnaturação do DNA (ácido desoxirribonucleico), resultando em alterações da síntese de proteínas e duplicação celular (FITÓ; LA TORRE; COVAS, 2007). Dessa forma, substâncias capazes de retardar ou inibir o efeito danoso dessas espécies reativas podem ser promissoras para o tratamento e o alívio desses estados patológicos, de modo que, podem se tornar potentes drogas analgésicas e/ou anti-inflamatórias.

Existem muitos desafios para o alívio/tratamento da dor, apesar do avanço no desenvolvimento das terapias de controle da dor, ainda há uma carência de analgésicos potentes e com menos efeitos adversos o que torna a pesquisa por medicamentos alternativos e complementares uma necessidade. Grande parte dos medicamentos terapêuticos disponíveis para o tratamento da dor, como os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e os opióides, são oriundos da fitoterapia (HEBERT; BARICE; HENNEKENS, 2014).

O uso produtos vegetais para fins terapêuticos têm ocorrido de forma crescente em todo o mundo. Os óleos essenciais, que são misturas de produtos químicos voláteis extraídos de plantas, e seus principais constituintes (monoterpenos e fenilpropanoides) têm se destacado por sua diversidade de efeitos farmacológicos (DE SOUSA, 2011). Esses constituintes têm apresentado diversas atividades biológicas em modelos animais, incluindo a atividade analgésica (SARMENTO-NETO *et al.*, 2015). Além dos estudos *in vivo*, a química computacional associada à bioinformática também tem conduzido o processo de desenvolvimento de novos fármacos com atividade analgésica. Inclusive o *docking* molecular também pode ser utilizado como um modelo preditivo para auxiliar na elucidação do mecanismo de ação de uma droga analgésica (ASSIS *et al.*, 2020).

Estudos têm elucidado a atividade antinociceptiva de diferentes fenilpropanoides, como por exemplo, o eugenol (KURIAN *et al.*, 2006), siringina (US *et al.*, 2015), e o anetol (RITTER *et al.*, 2013). O 2-alilfenol (2-AF) também é um fenilpropanoide sintético, estruturalmente relacionado ao cardanol, timol e orto-eugenol que apresenta estrutura similar ao ginkgol isolado do fruto ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) (ZHAOLI *et al.*, 1995; MENG *et al.*, 2007).

De acordo com dados do nosso grupo de Psicofarmacologia/UFPB (ASSIS, 2016) o 2-AF promoveu antinocicepção nos modelos de nocicepção química (teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, nocicepção induzida por glutamato e no teste da formalina), mas não no modelo de nocicepção térmica (teste da placa quente), o que caracteriza um perfil de resposta anti-inflamatória com participação do sistema glutamatérgico e adenosinérgico, sem o envolvimento direto do sistema opioide e dos canais para K⁺ ATP (ARAGÃO NETO *et al.*, 2019).

A partir destes resultados obtidos com o estudo mencionado acima, o presente estudo teve o objetivo de investigar os mecanismos pelos quais o 2-AF promove seu efeito antinociceptivo, avaliando a atividade antioxidante e caracterizando a resposta anti-inflamatória. O aumento do conhecimento sobre efeitos farmacológicos do 2-AF poderá despertar o interesse dos pesquisadores para o desenvolvimento de um novo medicamento.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Dor

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain – IASP*), a dor é definida como: “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido” (RAJA *et al.*, 2020). De acordo com tal conceito a dor engloba dois componentes, um capaz de causar dano perceptível (nocicepção) e outro que induz um estado psicológico onde o indivíduo experimenta sofrimento ou desconforto (denominado dor) (SNEDDON, 2019).

A dor é uma experiência pessoal que pode variar em intensidade, qualidade e duração, podendo ser influenciada por fatores biológicos, psicológicos e sociais. Dor e nocicepção são fenômenos diferentes, uma vez que a dor não pode ser inferida apenas da atividade sensoriais dos neurônios (RAJA *et al.*, 2020).

Apesar de a dor e a nocicepção serem considerados fenômenos distintos, a dor de lesão não pode ocorrer sem nocicepção. A detecção do dano é a captação do estímulo nocivo por transdutores especializados ligados às fibras Aδ e C, nociceptores, os quais respondem a estímulos que ameaçam produzir lesões ao organismo e transmitem essa informação aos centros reflexos e ao sistema nervoso central para processamento. Estímulos nocivos são aqueles que podem ou causam danos aos tecidos, como temperaturas extremas (<10°C e >40°C em mamíferos), alta pressão mecânica e produtos químicos, como ácidos (DIOGO; SILVA, 2009; SNEDDON, 2018).

A dor pode ser classificada de acordo com a origem ou de acordo com a duração. Quanto à duração, a dor pode ser considerada aguda ou crônica. A dor aguda possui um valor biológico importante de preservação da integridade do indivíduo, pois caracteriza-se por um sintoma que alerta para ocorrências de lesões no corpo, possui início súbito, de fácil localização, de duração previsível,

limitada à área afetada (DIOGO; SILVA, 2009; VASCONCELOS; ARAÚJO, 2018). Já a dor crônica ocorre quando persiste por um tempo maior, e está associada à destruição tecidual, à processos patológicos crônicos ou decorrentes de lesões do SNC (RAJA *et al.*, 2020; TROUVIN; PERROT, 2019).

Com relação à origem, a dor pode ser classificada como nociceptiva, neuropática ou inflamatória. A dor nociceptiva ocorre por ativação direta e/ou excessiva de nociceptores de tecidos cutâneos (dor somática) ou profundos (dor visceral). A dor neuropática ocorre devido a alterações na estrutura e ou função dos nociceptores, resultante de lesão seletiva do trato neoespinotalâmico (dor central) ou de lesões no sistema nervoso periférico (dor periférica) (CARDOSO, 2012). Há ainda a dor de origem inflamatória, sustentada pela sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios, levando a situações de hiperalgesia, caracterizada por dor exacerbada frente a um estímulo nocivo, ou alodínia, caracterizada pela sensação de dor ocasionada por exposição a estímulos não nocivos (LOESER; TREEDE, 2008; DOS SANTOS, 2013).

2.1.1. Fisiopatologia

Os aspectos que envolvem a neurofisiologia da dor podem ser divididos didaticamente em quatro processos distintos: transdução, transmissão, modulação e percepção (KELLY *et al.*, 2001).

(1) Transdução: essa etapa se refere à transformação de um estímulo nocivo mecânico, térmico ou químico em impulsos elétricos pelos neurônios sensoriais periféricos fisiologicamente especializados que respondem a estímulos nocivos, a saber, nociceptores. Estas são terminações nervosas periféricas encontradas na maioria dos tecidos do corpo, incluindo pele, tecido somático profundo (por exemplo, músculos e articulações) e as vísceras (HUDSPITH, 2016; MOFFAT; RAE, 2011). Elas são excitadas apenas por estímulos intensos, sugerindo que tenham propriedades biofísicas e moleculares que as permitam detectar seletivamente estímulos nocivos. Os nociceptores possuem canais iônicos como TRP (receptores de potencial

transiente), canais de sódio como os sensíveis à tetrodotoxina e receptores acoplados à proteína G, que transduzem a energia do estímulo em potenciais de ação para o axônio que conduz os estímulos até a medula espinal (WOOLF; MA, 2007).

(2) Transmissão: refere-se à propagação do impulso elétrico do sistema nervoso periférico até o sistema nervoso central. Os processos centrais dos neurônios aferentes primários entram na medula espinal através das raízes dorsais, onde fazem sinapses com neurônios de segunda ordem no corno dorsal. Além disso, os axônios descendentes do tronco cerebral fazem sinapses no corno dorsal e modulam a transmissão nociceptiva. Assim, um estímulo essencialmente nocivo é capaz de estimular um nociceptor que transduz o sinal gerando potencial de ação que percorre pela fibra nociceptiva. Essas fibras são classificadas de acordo com suas características anatômicas, velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al*, 2009; BRIDGESTOCK; RAE, 2013; HUDSPITH, 2016).

Os nociceptores polimodais C estão presentes em maior quantidade e são sensíveis a ampla gama de estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos. Apresentam condução lenta (<3 m / segundo) e estão associados a uma dor "em queimação" prolongada. Os A δ estão associados a uma dor "aguda" mais breve e apresentam uma condução mais rápida (5–30 m / segundo), são mielinizados e respondem a estímulos mecânicos e térmicos (BRIDGESTOCK; RAE, 2013; HUDSPITH, 2016; MOFFAT; RAE, 2011). Existem ainda fibras nociceptivas silenciosas ("silent" ou "sleeping"), que compreendem uma proporção das fibras aferentes, que normalmente não são responsivos a estímulos. No entanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizadas e responsivas (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al*, 2009).

As fibras nociceptivas do tipo C podem ser classificadas em dois grandes grupos: o primeiro é o grupo chamado de peptidérgica, o segundo grupo é o de fibras C não-peptidérgicas. O grupo de peptidérgica expressam o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e neurotransmissores peptídicos substância P (SP), e também os receptores de tirosina quinase A

(TrKA), que possuem alta afinidade ao fator de crescimento do nervo (NGF); O grupo de fibras C não-peptidérgicas expressam o receptor P2X3, um subtipo de canal iônico sensível ao ATP (BESSON, 1999; HUNT; MANTYH, 2001; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al*, 2009).

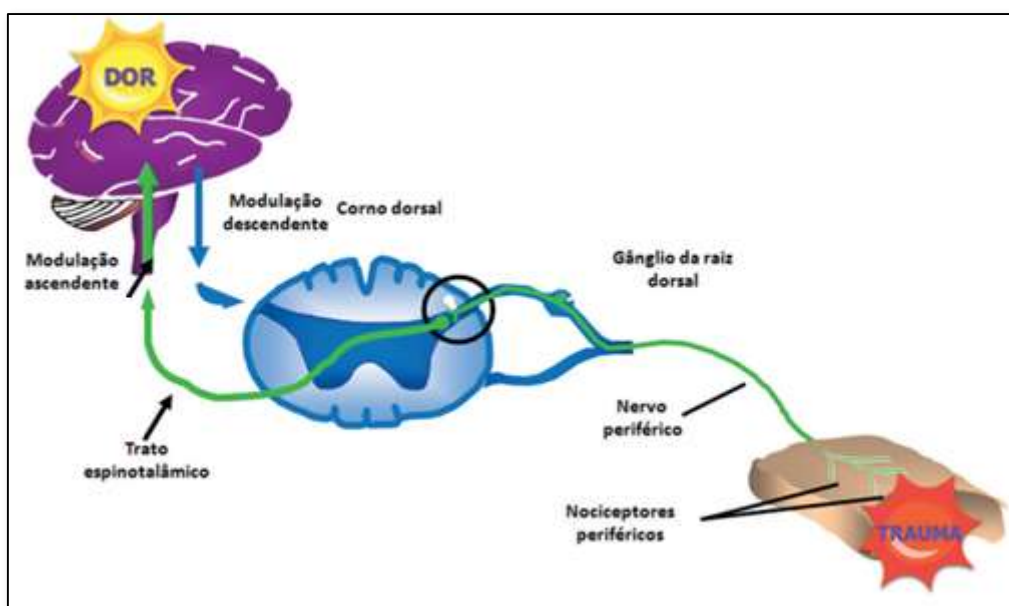
As fibras sensoriais podem responder a diferentes estímulos e estão presentes na cabeça e no corpo, tendo seus corpos celulares no gânglio trigeminal ou no gânglio da raiz dorsal (GRD), respectivamente. Os impulsos nervosos chegam através dos neurônios aferentes primários à substância cinzenta da medula espinal, especificamente no corno dorsal. A massa cinzenta é subdividida em 10 lâminas. As lâminas I – VI correspondem ao corno dorsal. As fibras C e A δ terminam na lâmina I (zona marginal) e lâmina II (substância gelatinosa). Porém algumas fibras A δ também terminam na lâmina V. Os interneurônios excitatórios ou inibitórios que regulam o fluxo de informação nociceptiva estão localizados nas lâminas V e VI. As células sensíveis a estímulos inócuos, como por exemplo, um toque leve, mas não a estímulos nocivos, estão presentes nas lâminas III e IV; estes são conhecidos como neurônios de baixo limiar (LT) (BRIDGESTOCK; RAE, 2013; HUDSPITH, 2016; MOFFAT; RAE, 2011).

A informação nociceptiva é transmitida do corno dorsal para estruturas supraespinhais através de neurônios de segunda ordem, que constituem as vias ascendentes e fazem sinapse com os neurônios aferentes primários. Os neurônios de segunda ordem e também interneurônios localizados no corno dorsal da medula espinal são ativados pela liberação de neurotransmissores (como glutamato e SP) dos aferentes primários, e este processo também é mediado por canais de cálcio e sódio (BESSON, 1999, JULIUS; BASBAUM, 2001, MILLIGAN; WATKINS, 2009).

A entrada nociceptiva para o corno dorsal é retransmitida para os centros superiores do cérebro por meio de várias vias ascendentes. Dentre as vias ascendentes (espinotalâmica, espinoreticular, espinomesencefálica, cervicotalâmica e espinohipotalâmica), a via espinotalâmica é a mais proeminente na propagação do estímulo nociceptivo, se origina dos neurônios

nas lâminas I e V-VII. A maioria dos axônios cruza localmente e sobe contralateralmente. As células da lâmina I desenvolvem-se para a parte posterior do núcleo ventromedial do tálamo e medeiam a percepção emocional autônômica e desagradável da dor. Os neurônios nas lâminas mais profundas se projetam para o núcleo pósterolateral ventral do tálamo e levando os aspectos discriminativos da dor (BRIDGESTOCK; RAE, 2013; HUDSPITH, 2016; MOFFAT; RAE, 2011). Além disso, estruturas do sistema límbico estão envolvidas na resposta emocional e afetiva à dor, como diferentes áreas da amígdala e do hipocampo (Figura 1) (BESSON, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; CALVINO; GRILO, 2006; PERL, 2011).

Figura 1: Via nociceptiva ascendente



Fonte: Adaptado de POSSO, I. P.; ROMANEK, R. M.; GATTO, 2012

(3) Modulação: a propagação do estímulo nociceptivo sofre modificações através de mecanismos endógenos, como a liberação de neurotransmissores, mediada por interação entre neurônios medulares e impulsos das vias descendentes originadas no tronco encefálico e encéfalo. Há a participação de vários sistemas de neurotransmissores endógenos, como noradrenérgico, opioidérgico, serotoninérgico, adrenérgico, colinérgico,

adenosinérgico, glutamatérgico e gabaérgico (MILLAN, 2002; OSSIPOV, DUSSOR, PORRECA, 2010).

O organismo possui mecanismos intrínsecos de controle da dor, uma vez que após a estimulação dos diferentes núcleos do tálamo, os sinais podem ser transmitidos para diversos locais do córtex sensorial somático, hipotálamo, amígdala, cerebelo e substância cinzenta periaquedutal (SCPD). A modulação da dor existe na forma de um circuito modulador descendente da dor com entradas que surgem em várias áreas, incluindo a amígdala, o hipotálamo e o córtex cingulado anterior rostral (rACC), alimentando a SCPD do mesencéfalo, e com saídas do SCPD para a medula. Neurônios dentro do núcleo magno da rafe e do núcleo reticularis gigantocelular, que estão incluídos na medula ventromedial rostral (RVM), mostraram se ramificarem para o corno dorsal espinhal ou medular para elevar direta ou indiretamente ou rebaixar o tráfego nociceptivo, alterando a experiência de dor. Esse circuito é responsável pela liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula espinhal (com a participação principalmente de serotonina e noradrenalina) que conseguem promover inibição da informação nociceptiva. Assim, cada lesão induz um tipo diferente de resposta devido à plasticidade do sistema nervoso (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004; JONES; DUNLOP, 2007; OSSIPOV, 2012; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

(4) Percepção: é a última etapa do processo de sinalização nociceptiva realizada no encéfalo, e está relacionada à experiência física e emocional provocada pelo estímulo nociceptivo. As áreas do córtex somatossensorial primário e secundário e córtex associativo, como o córtex parietal, estão envolvidos na gênese da percepção da dor como qualidade, localização, intensidade e duração. Os neurônios do tálamo projetam axônios para outras áreas do córtex envolvidas na resposta emocional à dor como o córtex frontal, insular, e cingulado anterior, além de projeções para áreas motoras. Eles definem a percepção das características somáticas do estímulo e são responsáveis pelos aspectos cognitivos e afetivos da sensação de dor (CALVINO; GRILO, 2006; TRACEY; MANTYH, 2007; MOFFAT; RAE, 2011).

2.2. Estresse Oxidativo

2.2.1. ERO/ERN

Os organismos aeróbicos necessitam do oxigênio (O_2) atmosférico para sobreviverem, uma vez que o O_2 é fundamental para a produção de energia sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP), por meio da cadeia respiratória da mitocôndria (GIROUD *et al.*, 2013; KAPOOR *et al.*, 2019; SONAM *et al.*, 2017). Embora seja essencial à vida, o O_2 pode causar danos ao organismo porque cerca de 5% do O_2 inalado segue uma via alternativa e é destinado à produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que podem ser potencialmente tóxicas (KIM *et al.*, 2015). EROs e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) são moléculas altamente reativas, formadas por oxigênio e/ou nitrogênio. Elas podem ser de duas formas:

(A) *Radicais livres* – contém um ou mais elétrons desemparelhados. Ex: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\bullet OH$), alcóxila ($RO\bullet/LO\bullet$), peróxila ($ROO\bullet/LOO\bullet$), hidroperoxila ($HO_2\bullet$), óxido nítrico ($\bullet NO$) e dióxido de nitrogênio ($\bullet NO_2$).

(B) *Não radicais livres* – não contém elétrons desemparelhados, mas são também altamente reativos. Ex: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HClO$), ozônio (O_3), oxigênio singlete (1O_2), peróxidos lipídicos ($LOOH$) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (KIM *et al.*, 2015; VALKO *et al.*, 2007).

As fontes para a produção de EROs/ERNs são tanto endógenas como exógenas. Entre as fontes endógenas, está a principal fonte de geração dessas espécies reativas, a mitocôndria. Além desta organela, temos ainda os peroxissomos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, o citocromo P450, bem como a via da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. Já as fontes exógenas incluem: radiações ionizantes, metais iônicos, xenobióticos, inseticidas, tabaco, infecções e alguns medicamentos, como os barbitúricos (KIM *et al.*, 2015; MANI, 2015; SONG; RISKS, 2015).

As EROs/ERNs têm um papel duplo, exercem tanto efeitos benéficos como prejudiciais. Estas espécies reativas são produzidas normalmente pelo metabolismo celular e seus efeitos benéficos ocorrem em baixas concentrações, tendo uma função fisiológica na resposta celular a um agente nocivo, participando da defesa contra agentes infecciosos, bem como nas vias de sinalização celular. No entanto, em altas concentrações, as EROs/ERNs têm efeito prejudicial, sendo responsáveis por danos causados às estruturas celulares, como lipídios, proteínas e DNA (KAPOOR *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2015)

2.2.2. Antioxidantes

O organismo dispõe de mecanismos homeostáticos que promovem um controle dos níveis de EROs/ERNs. As substâncias capazes de retardar ou inibir os efeitos prejudiciais da oxidação causada pelas espécies reativas são denominadas antioxidantes, que podem ser enzimáticos (superóxido dismutase – SOD, glutathione peroxidase e catalase) ou não-enzimáticos (vitaminas C e E, glutathione, carotenoides, flavonoides e outros) (GULCIN, 2020; KAPOOR *et al.*, 2019).

Um bom antioxidante apresenta várias características, entre elas: atacar preferencialmente os radicais livres; interagir com outros antioxidantes, regenerando-os; ser rapidamente absorvidos; ter uma concentração relevante nos fluidos e tecidos biológicos (VALKO *et al.*, 2006). Além disso, um antioxidante pode sequestrar as EROs/ERNs, impedindo a continuidade das etapas na cadeia de reações destas espécies. Uma vez sequestrados, os radicais livres são convertidos a espécies menos reativas (HUANG; OU; PRIOR, 2005; KAPOOR *et al.*, 2019).

Em condições normais, os antioxidantes controlam o efeito oxidativo das EROs/ERNs, havendo um equilíbrio nas concentrações destas espécies reativas. No entanto, quando há um desequilíbrio neste balanço, quer seja por aumento de EROs/ERNs ou por diminuição de antioxidantes, ocorre o chamado estresse oxidativo ou nitroxidativo (HUYUT; BEYDEMIR; GÜLÇİN, 2017). Esse estresse devido ao acúmulo de EROs/ERNs causa, então, injúrias

em diversas estruturas celulares (DNA, lipídios e proteínas) como mencionado anteriormente.

2.2.3. Dor, Inflamação e Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo está intimamente relacionado com o desenvolvimento de uma série de doenças, entre elas, diabetes *mellitus*, câncer, artrite reumatoide, dor e inflamação, envelhecimento, lesões de pele, bem como doenças neurológicas (AKDEMIR *et al.*, 2016; GULCIN, 2020; HUYUT; BEYDEMIR; GÜLÇIN, 2017).

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na proporção entre pró-oxidantes e antioxidantes na célula. O estresse oxidativo afeta predominantemente o cérebro e essa vulnerabilidade é devido, principalmente, ao intenso metabolismo aeróbico e perfusão sanguínea, o que gera grande quantidade de EROs/ERNs (HALLIWELL, 1992; PANFOLI *et al.*, 2018).

EROs/ERNs estão também associadas com o desenvolvimento de estados de dor persistente, incluindo dor neuropática e dor inflamatória (SALVEMINI *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2007). Estudos mostraram que antioxidantes, como a vitamina E, são muito eficientes em aliviar a hiperalgesia mecânica em ratos, num modelo de dor neuropática (KIM *et al.*, 2004; YOWTAK *et al.*, 2011). Os antioxidantes também foram bastante efetivos na redução da hiperalgesia e de indicadores da inflamação após a injeção de carragenina (WANG *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2021), capsaicina (LEE *et al.*, 2007; SCHWARTZ *et al.*, 2009), e formalina (HACIMUFTUOGLU *et al.*, 2006; SCHWARTZ *et al.*, 2008), por via intraplantar em ratos e camundongos, sugerindo a relação das EROs com o desenvolvimento e manutenção da dor através de vários mecanismos.

Gao *et al.* (2007) demonstraram que EROs tem relação com a neurotransmissão glutamatérgica, estando envolvidas no aumento da fosforilação do receptor NMDA na medula espinhal em modelos animais de dor, o que resulta na sensibilização central e, conseqüentemente, na dor, de maneira rápida e reversível.

Já Yowtak *et al.* (2011) demonstraram que EROs contribuem para a dor neuropática via neurotransmissão GABAérgica, através da redução da liberação espinhal de GABA. Contudo, o mecanismo fundamental pelo qual a redução de EROs promove alívio da dor ainda não é bem esclarecido (SCHWARTZ *et al.*, 2009).

Já em relação à inflamação, é bem descrito que EROs/ERNS produzidas em excesso estão implicadas na fisiopatologia da inflamação (KATAOKA *et al.*, 1997; MICKALAD *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2003), inclusive, tem sido sugerido que a atividade anti-inflamatória dos AINEs pode ser, em parte, devido a sua capacidade de interferir com as reações mediadas pelos radicais livres (MAFFEI *et al.*, 1993; BLASER *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2019).

2.3. Limitações na terapia farmacológica da dor

O tratamento farmacológico para o controle da dor é pautado basicamente por três grupos de drogas analgésicas:

- I) Analgésicos periféricos representados pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES);

Os AINEs são ácidos orgânicos fracos que atuam principalmente nos tecidos inflamados e se ligam, significativamente, à albumina plasmática. O mecanismo de ação dos AINEs, seus efeitos terapêuticos e colaterais resultam principalmente da inibição da enzima ciclooxigenase (COX), diminuindo a síntese das prostaglandinas (PGs) e reduzindo a intensidade do processo inflamatório (MONTEIRO *et al.*, 2008; MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009). Os AINEs apresentam propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. São principalmente indicados para o tratamento de doenças reumáticas e não-reumáticas como, osteoartrite, artrite psoriática e artrite reumatoide. Também tem indicação para o tratamento de dor leve e moderada devido as suas propriedades analgésicas prolongadas e diminuem a temperatura corporal elevada sem provocar dependência química (MONTEIRO *et al.*, 2008; MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009).

Todos AINEs convencionais têm a tendência de causar efeitos adversos; ao bloquear as enzimas COXs, os AINEs ocasionam por exemplo: efeitos gastrointestinais como ulceração devido inibição das PGs protetoras da mucosa gástrica. Além disso também promovem a inibição das PGs de efeito vasodilatador, estimulando a vasoconstrição renal e diminuindo a taxa de filtração glomerular, acarretando numa necrose tubular aguda. Por fim, a inibição PGs ativam os linfócitos T que estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatória, movimenta o ácido araquidônico para a via das lipoxigenases, expandindo a síntese de leucotrienos pró- inflamatórios e faz com que a enzima lipoxigenase induz a permeabilidade capilar, causando assim proteinúria por alterar a barreira de filtração glomerular (CASTEL-BRANCO *et al.*, 2013; SANDOVAL *et al.*, 2017).

- II) Fármacos adjuvantes, como os antidepressivos, anticonvulsivantes, ansiolíticos e antipsicóticos;

Os fármacos adjuvantes que são usados como analgésicos, particularmente para tratar estados dolorosos neuropáticos, que respondem mal aos analgésicos convencionais. Esse grupo inclui os antidepressivos tricíclicos, particularmente imipramina e amitriptilina. Estes fármacos atuam centralmente, inibindo captura da noradrenalina e são altamente eficazes em aliviar dor neuropática em alguns casos, porém podem apresentar alguns efeitos adversos, como: boca seca, diplopia, constipação, sedação, tontura, náusea, insônia, ganho ou perda de peso, tremores de extremidades e palpitações. Antiepilépticos, como a carbamazepina e gabapentina são muitas vezes eficazes na dor neuropática (ABRANTES *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2007; BRASIL; BELISÁRIO FILHO, 2000).

- III) Analgésicos de ação central como os opióides.

O terceiro grupo são os analgésicos de ação central tais como os fármacos opióides, a exemplo da morfina e da codeína. São úteis no tratamento de dor viscerais difusas, dores associadas ao câncer e na analgesia pré e pós-cirúrgica. O mecanismo de ação destes fármacos envolve a ativação dos receptores opióides μ (mu), δ (delta) e κ (kappa). O uso de opióides, como

a morfina, em tratamento doloroso é limitado pelos diversos efeitos indesejados, e também o uso prolongado pode ocasionar tolerância com consequente redução da analgesia em uma dose fixa. Outra desvantagem é a possibilidade de acarreta em síndrome de abstinência ao findar o uso (MCDONALD; LAMBERT, 2013; MIZOGUCHI *et al.*, 2012; SILVA, 2020).

2.4. Modelos animais para avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de substâncias.

Levando em consideração efeitos adversos dos fármacos disponíveis no mercado, surge a necessidade do estudo de novos compostos com atividades efetivas com menor potencial de toxicidade. A seleção dos compostos promissores dentro da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória tem seu início pela medicina popular seguida de avaliação química desses produtos. A dor apresenta diferentes vias de sinalização, o que faz com que seja necessário a utilização de diferentes modelos experimentais que diferencie uma possível atividade nociceptiva de um composto por mecanismos centrais ou periféricos (resposta inflamatória) (SILVA, et al. 2013; ALMEIDA, 2019).

Nesses casos o uso termo “dor” é mais voltado para seres humanos, tendo vista que os animais são menos capazes de manifestar os componentes subjetivos da dor. Logo, termos como nocicepção e antinocicepção são mais adequados para animais (JONES, 1996).

Os principais modelos experimentais utilizados para avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de substâncias, são subdivididos em modelos de nocicepção por estímulos **químicos** (contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina, dor orofacial induzida pela formalina, edema intraplantar induzido por carregenina, peritonite induzida por carragenina), **térmicos** (teste de retirada da cauda, teste da placa quente) e **mecânicos** (teste de Randall-Selitto, teste de Von Frey).

Essas metodologias são bastantes utilizadas por serem modelos simples, rápidos, confiáveis, reprodutíveis e sensíveis para fármacos com efeito

antinociceptivo e/ou anti-inflamatório (SILVA, et al. 2013; ALMEIDA, 2019). Um exemplo disso podemos ver no artigo de revisão de DE SOUSA (2011), no qual é relatado cerca de 40 trabalhos envolvendo a atividade analgésica de constituintes de óleos essenciais, em roedores. Desses 40 trabalhos, para avaliação da atividade analgésica dos constituintes de óleos essenciais, 62,5% utilizaram o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, 40,0% dos trabalhos o teste da formalina e 37,5% utilizaram o teste da placa quente.

2.5. Docking molecular

O uso de abordagens *in silico* como quimioinformática, modelagem molecular e a inteligência artificial (IA) aumentou significativamente nas últimas décadas, considerando os recentes desenvolvimentos em tecnologia de computador e o rápido aumento de dados estruturais, biológicos e químicos disponíveis em um número cada vez maior de alvos terapêuticos. As abordagens *in silico* permitem a triagem virtual de milhões de compostos em um tempo acessível, reduzindo os custos iniciais de identificação de acertos e melhorando as chances de encontrar os candidatos a fármacos desejados (PINZI; RASTELLI, 2019).

Atualmente, várias técnicas de modelagem molecular estão disponíveis para facilitar as tarefas de descoberta de drogas com potencial terapêutico, bem como seus mecanismos de ação, a maioria delas sendo classificadas em abordagens baseadas em estrutura e em ligantes.

O *docking* molecular está entre um dos métodos *in silico* mais bem sucedidos, baseados em estrutura, ajudando a prever as interações que ocorrem entre moléculas e alvos biológicos. Este processo é geralmente realizado primeiro prevendo a orientação molecular de um ligante dentro de um receptor, o que ajuda a compreender como os compostos químicos interagem com seus alvos moleculares (PINZI; RASTELLI, 2019; SALMASO; MORO, 2018). A primeira etapa de um cálculo de *docking* é obter a estrutura alvo, que comumente consiste em uma grande molécula biológica (proteína, DNA ou

RNA) tais macromoléculas podem ser obtidas do Protein Data Bank (PDB), que fornece acesso a coordenadas atômicas 3D (TORRES *et al.*, 2019).

A técnica de *docking* molecular envolve a predição da pose entre duas moléculas (proteína-ligante ou proteína-proteína), dentro de um sítio de ligação direcionado de uma estrutura proteica, e a estimação do cálculo da sua afinidade de ligação (KASTRITIS *et al.*, 2011), com isso é possível observar as interações entre o ligante e os resíduos pertencentes ao sítio de ligação do receptor, como por exemplo, ligações de Hidrogênio e interações eletrostáticas e de van der Waals. Em geral, existem dois objetivos principais em estudos de *docking*: energia de afinidade do ligante pela proteína e correta predição da pose do ligante (KITCHEN *et al.*, 2004; PINZI; RASTELLI, 2019; TORRES *et al.*, 2019).

O método de *docking* precisa de dois componentes principais: o algoritmo de busca e uma função de pontuação (*scoring*). A primeira etapa é a aplicação do algoritmo que representa pequenas espécies químicas (ligantes) no sítio ativo de dada proteína, com o intuito de detectar a melhor pose do ligante (TORRES *et al.*, 2019).

Em segundo momento, são utilizadas funções de *scoring* que são designadas para predizer a atividade biológica por meio da interação do ligante com a proteína. Em suma, as funções de *scoring* são usadas para avaliar os modos de interação entre o ligante e a proteína, direcionando a busca para conformações de ligante com maior afinidade pelo receptor.

As funções de *scoring* podem ser divididas em três classes principais: baseada em campo de força, empírica e baseada em estruturas conhecidas (WANG *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2010). O método baseado em campo de força utiliza os campos de força clássicos e consiste no somatório de termos de energia. Os métodos empíricos são baseados na correlação da energia livre de ligação com uma soma ponderada de variáveis não relacionados. O método baseado em estruturas conhecidas se baseia na análise estatística da interação de pares de átomos a partir do complexo proteína-ligante com

estruturas tridimensionais disponíveis (PINZI; RASTELLI, 2019; SALMASO; MORO, 2018; TORRES *et al.*, 2019).

2.6. Produtos naturais como alternativa para o tratamento da dor

É contínua a necessidade da busca por compostos que desempenhe um papel terapêutico satisfatório e com menos efeitos indesejáveis. Os produtos naturais vêm se destacando por apresentar diversos efeitos terapêuticos no tratamento das mais variadas afecções, como por exemplo: a dor (ANDRADE *et al.*, 2020; MACEDO *et al.*, 2019).

Os produtos naturais têm se destacado devido aos benefícios que podem oferecer ao homem, tanto para subsistência como para comércio e desenvolvimento, tais como: medicamentos, alimentos, óleos, entre diversos outros recursos (MACEDO *et al.*, 2019). As plantas são fontes de compostos biologicamente ativos e são reconhecidas desde a antiguidade por seus efeitos benéficos à saúde (FIRMO *et al.*, 2012; SCHREINER *et al.*, 2012). O uso recente de plantas como medicamentos envolveu o isolamento de compostos ativos, como por exemplo, o isolamento da morfina do ópio no início do século XIX. A descoberta de drogas a partir de plantas medicinais levou ao isolamento de drogas primitivas como cocaína e codeína, dentre outras (BALUNAS, KINGHORN, 2005).

Dentre a grande variedade de produtos naturais existentes, apenas uma pequena parcela tem suas caracterizações fitoquímica e potencial biológico estudado. A extração, o isolamento, a identificação e obtenção de análogos estruturais dos metabólitos biologicamente ativos, associado ao potencial farmacológico e o conhecimento toxicológico são fundamentais para obtenção de novos agentes terapêuticos (ALMEIDA, 2019).

2.6.1. Óleos Essenciais

Dentre os produtos naturais, os óleos essenciais, são extraídos de plantas aromáticas constituídos de misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com aroma acentuado e líquido, vêm se destacando na última década devido ao grande número de propriedades biológicas apresentadas, especialmente por seus constituintes, como; os terpenos e fenilpropanoides que são substâncias voláteis de baixo peso molecular presentes nos óleos essenciais (DE SOUSA, 2011; LEITE *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Em termos fitoquímicos, essas duas classes originam-se de precursores diferentes e são sintetizados por rotas metabólicas distintas. É sabido que os terpenos representam a maior classe de constituintes dos óleos essenciais, no entanto, os fenilpropanoides, também estão presentes em quantidades significativas (SANGWAN *et al.*, 2001). Dentre as atividades biológicas apresentadas, podemos destacar; atividade anti-hiperglicêmico, anti-inflamatória, analgésico, antitumoral, antiparasitárias, antimicrobiano, antifúngico e antiviral (DE SOUSA, 2011; LEITE *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

2.6.2. Fenilpropanoides

Os compostos fenólicos de origem vegetal compõem um grande grupo de metabólitos secundários de plantas com diversificações estruturais consideravelmente ricas e com uma grande variedade de funções e atividades biológicas (HARMATHA *et al.*, 2011).

Os fenilpropanoides representam um grande grupo de compostos orgânicos produzidos por plantas para protegê-las de infecções, radiações ultravioletas e herbívoros. Eles são sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina que é convertido em ácido cinâmico. O grupo ácido carboxílico do ácido cinâmico é reduzido, gerando os fenilpropanoides (SÁ *et al.*, 2014).

São substâncias voláteis de baixo peso molecular que possuem grande aplicabilidade na indústria de perfumaria, em cosméticos, e em produtos

alimentícios. Quimicamente os óleos essenciais são compostos principalmente de terpenóides e fenilpropanoides, além de policetídeos e poucos alcalóides (DE SOUSA, 2011). São compostos contendo a unidade C₆-C₃, ou unidade C₆-C₃-C₆ combinada, e seus dímeros ou oligômeros contêm átomos de carbono (HARMATHA *et al.*, 2011).

Dentre as mais variadas atividades biológicas encontradas nos fenilpropanóides (DE SOUSA, 2011), a atividade antinociceptiva tem sido frequentes em vários desses compostos, como; Orto-eugenol (FONSÊCA *et al.*, 2016), Eugenol (DANIEL *et al.*, 2009), Metileugenol (YANO *et al.*, 2006), Álcool cinâmico (ANDRADE *et al.*, 2020), siringina (CHOI *et al.*, 2004), anetol (CHAINY *et al.*, 2000).

2.6.3. 2-Alilfenol (2-AF)

O 2-AF é um fenilpropanoide amplamente comercializado na China sob o nome de Yinguo. Quimicamente este composto apresenta estrutura (Figura 2) similar ao ginkgol isolado do fruto ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) (ZHAOLI *et al.*, 1995; MENG *et al.*, 2007). Apresenta atividade fungicida já relatada na literatura contra as espécies *Botrytis cinérea*, *Rhizoctonia cerealis*, *Fulvia fulva*, *Sporisorium reilianum*, *Physalospora piricola*, *Valsa mali*, *Magnaporthe oryzae*, *Pythium aphanidermatum*, uma vez que afeta a respiração e diminui os níveis de ATP por um mecanismo ainda não descoberto (MENG *et al.*, 2007; QU *et al.*, 2008; XIA *et al.*, 2010).

O Ginkgo apresenta uma grande variedade de fitoquímicos, incluindo alcanos, carboidratos, lipídios, carotenóides, esteróis, benzenoides, fenilpropanoides e flavonóides. Os fenilpropanoides são considerados um dos principais componentes dentro dos metabólitos secundários das plantas, onde cumprem várias funções biológicas. Dentre esses compostos está o 2-alilfenol, que é extraído do exosperma da fruta *Ginkgo biloba*, sendo este um composto com atividade antibacteriana, antitumoral e antifúngica (CHACÓN, 2019).

Em *B. cinérea*, 2-AF inibe o patógeno fúngico pela indução de respiração cianeto resistente, causando diminuição de ATP, e inibindo a respiração (GONG *et al.*, 2009; CHACÓN, 2019).

O interesse pelo estudo do potencial antinociceptivo do 2-AF surgiu pela observação da semelhança estrutural desse fenilpropanoide com outras moléculas da mesma classe e que apresentam efeito antinociceptivo já relatado na literatura, como é o caso do eugenol (KURIAN *et al.*, 2006) e do anetol (RITTER *et al.*, 2013).

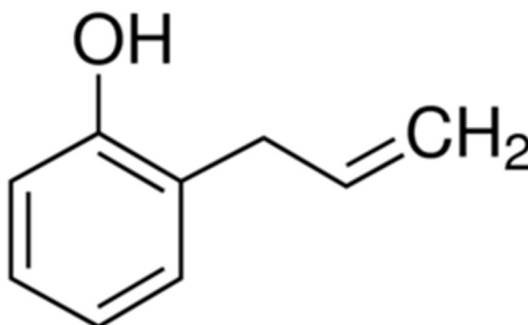


Figura 2: Estrutura química do 2-AF

Diversos estudos têm sido desenvolvidos em grandes centros de pesquisa, com o intuito de descobrir e comprovar as atividades biológicas de constituintes isolados de vários óleos essenciais de plantas utilizadas na medicina popular.

De acordo com Assis (2016) o 2-aliilfenol apresentou atividade antinociceptiva nos testes das contorções abdominais induzidas por ácido acético, nocicepção induzida por glutamato e na dose de 100 mg/kg apresentou uma intensa analgesia na 2ª fase do teste da formalina, caracterizando este fenilpropanoide com uma ação antinociceptiva periférica, semelhante à de fármacos anti-inflamatórios. Como prova disso, o 2-aliilfenol não apresentou efeito no modelo de nocicepção térmica (teste da placa quente), que avalia o envolvimento central da analgesia.

No estudo do mecanismo de ação antinociceptiva do 2-alilfenol foi elucidado que o mesmo exerce sua atividade antinociceptiva por meio do sistema adenosinérgico, não envolvendo o sistema opióide nem os canais de K^+ sensíveis a ATP (ASSIS, 2016). Entretanto outras vias envolvidas na modulação da dor, precisam ser estudadas. Logo, torna-se fundamental a continuidade da investigação da elucidação do seu mecanismo de ação neste estudo, assim como avaliar uma possível atividade anti-inflamatória e antioxidante do 2-alilfenol. O estudo *in silico* de possíveis alvos terapêuticos é uma alternativa necessária antes de procedimentos experimentais *in vivo*, uma vez que permite uma rápida análise e compreensão dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos na atividade farmacológica.

OBJETIVO

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do fenilpropanoide 2-alilfenol.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o envolvimento dos sistemas GABAérgico, nitroxiérgico e dopaminérgico no mecanismo de ação antinociceptivo do 2-alilfenol em modelos animais de dor;
- Avaliar *in silico* o envolvimento do receptor A2a no efeito antinociceptivo do 2-alilfenol;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do 2-alilfenol quantificando os níveis de TNF- α e IL-1 β .
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do 2-alilfenol;

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos Swiss machos com três meses de vida (25-35 g) provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) da Universidade Federal da Paraíba. Os animais foram expostos a condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), com livre acesso a uma dieta de ração tipo *pellets* (Purina®) e água disponível em garrafas de polietileno. Mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB -, sob a certidão de nº 4443051018.

4.2. Substância teste

O 2-alilfenol foi adquirido da SIGMA (St. Louis, MO, EUA). O veículo utilizado para solubilização deste composto é o Tween 80 em uma solução de 5% com salina. Conforme resultados obtidos em trabalhos anteriores (ASSIS, 2016), a DL50 do 2-alilfenol é 603 mg/kg e os tratamentos foram realizados nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg pela via intraperitoneal (i.p.).

4.3. Substâncias Utilizadas

- 2-alilfenol (SIGMA, E.U.A.);
- Ácido acético glacial (Reagen - Brasil);
- Água destilada (IPeFarM/UFPB – Brasil);
- Carragenina (Sigma – E.U.A.);
- Dexametasona (Aché – Brasil);
- Etanol (IPeFarM/UFPB – Brasil);
- Flumazenil (Cristália, Brasil);
- L-nitroarginina (L-NNA) (SIGMA, E.U.A.);
- Solução Tampão Fosfato-Salino (PBS) (IPeFarM – UFPB);
- Sulpirida (Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, Brasil);
- Tween 80 (Vetec – Brasil).

Minutos antes do início dos experimentos, as substâncias utilizadas foram dissolvidas em salina e quando necessário, era adicionado Tween 80, para facilitar a solubilização. As doses foram calculadas de forma a possibilitar a administração intraperitoneal de 0,1 mL/10 g de peso do camundongo, com exceção da carragenina que foi injetada por via intraperitoneal na quantidade de 300 µL e da dexametasona que foi administrada pela via subcutânea.

4.4. Condições experimentais

Os testes foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia do IPeFarM/UFPB, no período compreendido entre as 13:00 e as 17:00 h. No dia anterior ao experimento, os animais foram separados em grupos de no máximo 6 animais por gaiola. Além disso os animais foram pesados e transferidos para o local de realização dos testes, a fim de permitir sua ambientalização e minimizar o estresse provocado pela exposição a um novo ambiente, todos os animais foram utilizados uma única vez.

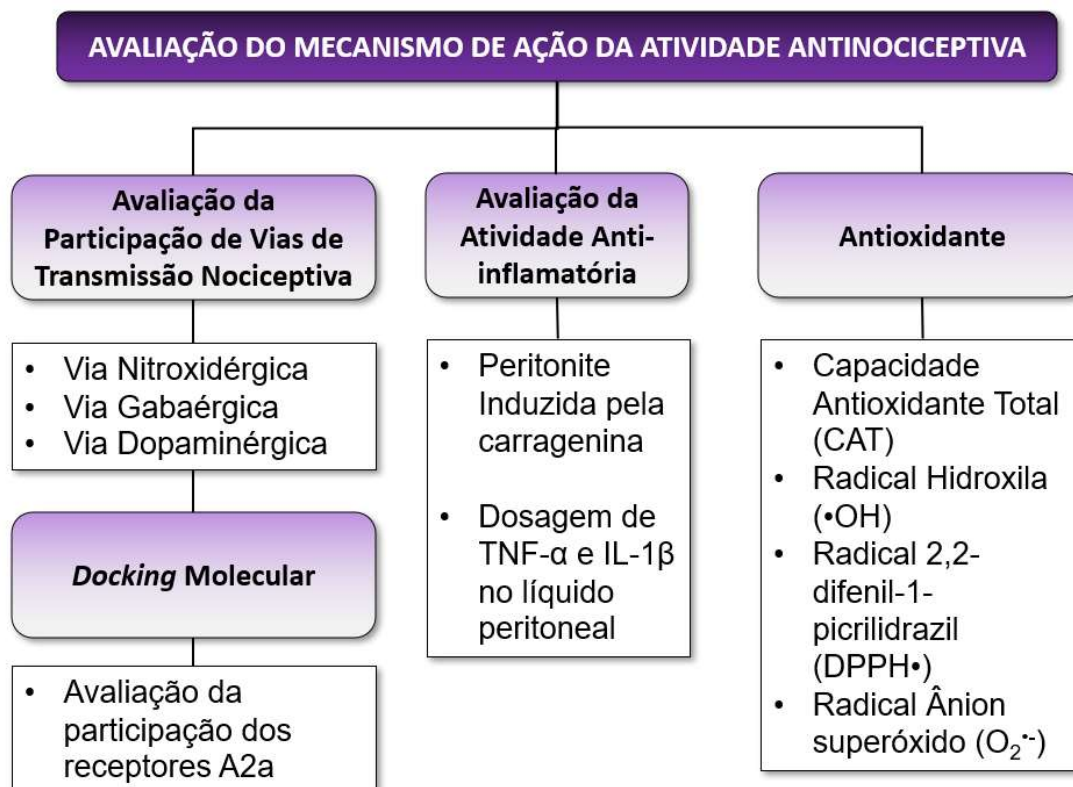
As bancadas metálicas e os aparelhos utilizados foram higienizados com álcool 70%, entretanto, durante os testes, foi utilizado etanol com baixo teor (10%), na tentativa de diminuir possíveis odores que pudessem interferir no comportamento dos animais.

Os métodos *in silico* foram executados em parceria com o Laboratório de Quimioinformática/IPeFarM-UFPB, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti.

As metodologias de avaliação da atividade antioxidantes foram desenvolvidas em parceria com o Prof. Dr. Arthur Antunes Jacome Vidal do Departamento de Bioquímica/UFRN.

4.5. Avaliação do mecanismo de ação antinociceptiva

Figura 3: Desenho Experimental.



4.5.1. Participação das vias Nitroxiérgica, Gabaérgica e Dopaminérgica no efeito antinociceptivo do 2-AF

Com o objetivo de determinar o(s) mecanismo(s) de ação envolvido(s) na atividade antinociceptiva do 2-AF, foi escolhida a dose de 75 mg/kg para a avaliação do efeito do composto frente a vários sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação do processo doloroso. Esta dose foi efetiva no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (ASSIS, 2016), modelo escolhido para esta investigação. A reversão da propriedade antinociceptiva do composto por um antagonista específico de neurotransmissores de vias que modulam o processo doloroso foi o critério adotado para a determinação do mecanismo de ação do mesmo. As vias de neuromodulação estudadas no presente trabalho foram: nitroxiérgica, dopaminérgica e a gabaérgica.

Descrito como um modelo clássico de nocicepção inflamatória visceral, o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, consiste na aplicação intraperitoneal de uma solução de ácido acético 1% provocando irritação no peritônio, promovendo uma resposta nociceptiva manifestada por contorções abdominais seguida de extensão dos membros posteriores (KOSTER *et al.*, 1959).

Os animais foram divididos em grupos de seis, e cada grupo recebeu um dos seguintes tratamentos: controle (Solução de Tween 80, 5%), 2-alilfenol, antagonista + controle e antagonista + droga-teste. O tratamento com os antagonistas foi realizado 15 minutos antes da administração do 2-alilfenol na dose de 75 mg/kg (i.p.) que foi uma dose intermediária efetiva nos modelos preliminares de analgesia (ASSIS, 2016), bem como no modelo das contorções induzidas pelo ácido acético.

Após os tratamentos os animais receberam solução de ácido acético 1% em água destilada (0,1 mL/10 g) por via i.p. e colocados em caixas de polietileno individuais, após 5 minutos da administração do ácido acético, foi contabilizado o número de contorções abdominais apresentadas por cada animal durante 10 minutos de observação. Uma redução significativa do número de contorções quando comparada ao grupo controle foi considerada como uma resposta antinociceptiva (NARAYANAN *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2006). A reversão da propriedade antinociceptiva do 2-alilfenol por um antagonista específico foi o critério adotado para a determinação do mecanismo de ação do mesmo. As vias de sinalização estudadas assim como os antagonistas utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Ferramentas farmacológicas utilizadas para o estudo das vias de sinalização envolvidas na possível antinocicepção mediada pelo 2-alilfenol.

Vias de sinalização	Antagonista
GABAérgica	Flumazenil (20 mg/kg, i.p.)
Nitroxidérgica	L-NNA (100 mg/kg, i.p.)
Dopaminérgica	Sulpirida (20 mg/kg, i.p.)

4.6. Estudo de *Docking* Molecular

A estrutura do 2-AF foi usada como arquivo para o software Marvin 14.9.1.0, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). Foi usado o software Standardizer [JChem 14.9.1.0, 2014; ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)] para canonizar a estrutura, adicionar hidrogênios, realizar conversões de formas aromáticas, limpar o gráfico molecular em três dimensões e salvar os compostos no formato sdf (IMRE *et al.*, 2003).

As estruturas do receptor de adenosina A2a humana em complexo com o ligante endógeno (PDB ID 2YDO) e o agonista UKA (PDB ID 3QAK) foram baixadas do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (LEBON *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2011). A estrutura do 2-AF foi submetida ao *docking* molecular usando o software Molegro Virtual Docker, v. 6.0.1 (MVD) (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006). Todos os compostos de água foram excluídos da estrutura da enzima, e as estruturas da enzima e do composto foram preparadas usando as mesmas configurações de parâmetro padrão do mesmo pacote de software (Função de Score: MolDock Score; Avaliação de ligante: ES interno, pontes de hidrogênio internas, torções Sp2-Sp2, todas verificadas; Número de execuções: 10 execuções; Algoritmo: MolDock SE; Interações máximas: 1500; Tamanho máximo da população: 50; Etapas máximas: 300; Fator de distância do vizinho: 1,00; Número máximo de posições retornadas: 5).

O procedimento de *docking* foi realizado usando um GRID de 15Å° no raio e 0,30 na resolução para cobrir o sítio de ligação do ligante com a estrutura do receptor de adenosina A2a. O algoritmo Moldock score [GRID] foi usado como função de score, e o algoritmo de pesquisa Moldock foi usado (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006).

4.6.1. Interações na superfície molecular

Estruturas tridimensionais (3D) foram usadas como dados de entrada no programa Volsurf+ v. 1.0.7, e foram submetidas a campos de interação molecular (MIF) (CRUCIANI *et al.*, 2000), para gerar superfícies moleculares

usando as seguintes sondas: N1 (sonda doadora de ligação amida nitrogênio-hidrogênio), O (sonda aceptora de ligação carbonil oxigênio-hidrogênio), OH2 (sonda de água) e DRY (sonda hidrofóbica).

4.7. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

4.7.1. Peritonite induzida pela carragenina

No intuito de investigar a possível atividade anti-inflamatória do 2-AF, foi avaliado inicialmente seu potencial em diminuir a migração leucocitária após a aplicação de um agente flogístico, através do método da peritonite induzida por carragenina (GRISWOLD *et al.*, 1987).

Para tanto, os animais foram divididos pelos seguintes grupos (n = 6) de tratamento: salina (i.p.), veículo (Tween 80, 5%, i.p.), 2-AF (50 e 100 mg/kg, i.p.) e dexametasona (2 mg/kg, s.c.). Após 30 min dos tratamentos, foi administrado 300µL de carragenina (1%, i.p.) para indução da inflamação peritoneal, com exceção do grupo salina. Após 4 horas, foi injetado na cavidade peritoneal 2mL de PBS gelado na cavidade peritoneal dos camundongos eutanasiados. O peritônio foi massageado por 30 segundos, e o líquido peritoneal foi aspirado e armazenado em tubos eppendorf. As amostras foram diluídas com solução de Turk (1:15). Com o auxílio de uma pipeta automática, a amostra diluída foi inserida na Câmara de Neubauer para contagem dos leucócitos em um microscópio óptico (FABRI *et al.*, 2014). Os resultados foram expressos em leucócitos/mL.

4.7.2. Dosagem de TNF- α e IL-1 β no líquido peritoneal

Após aspiração do líquido peritoneal dos animais tratados no experimento da peritonite induzida por carragenina, o líquido foi centrifugado a 1500 rpm/5 min/4°C. O sobrenadante foi retirado para a medição de TNF- α e IL-1 β usando o kit de ELISA específico seguindo as instruções do fabricante (Boster Biological Technology CO., Ltd, Pleasanton, CA, EUA). Os níveis de citocinas foram calculados a partir de curvas padrão e expressos em picograma por mililitro (pg/mL).

4.8. Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliar a atividade antioxidante do 2-AF, foram adotadas, quatro metodologias que se baseiam na capacidade de uma substância sequestrar radicais livres, através da interação direta de uma substância com moléculas reativas, convertendo os radicais livres em espécies menos reativas e, portanto, mais estáveis (HOELZL *et al.*, 2005).

4.8.1. Radical Hidroxila ($\bullet\text{OH}$)

A formação do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) a partir da reação de Fenton é quantificada usando a degradação oxidativa do açúcar 2-desoxirribose (LOPES; SCHULMAN; LIMA, 1999). O princípio do teste é a quantificação do produto de degradação deste açúcar, o malonaldeído (MDA), pela sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Reações típicas foram iniciadas pela adição de Fe^{2+} (FeSO_4 6 mM concentração final) à solução contendo 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de H_2O_2 e 20 mM de padrão fosfato (pH 7,4). Para medir a atividade antioxidante do AP contra o radical hidroxila, diferentes concentrações do 2-AF (0,25 a 5 mg/mL) foram adicionadas ao sistema antes da adição de Fe^{2+} . As reações serão realizadas por 15 minutos em temperatura ambiente, e estacionadas pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v) seguido por 1% de TBA (v/v, em 50 mM NaOH). As soluções foram aquecidas por 15 minutos a 95 °C, e então resfriadas em temperatura ambiente. A absorbância medida a 532 nm e os resultados expressos como percentagem de MDA formado.

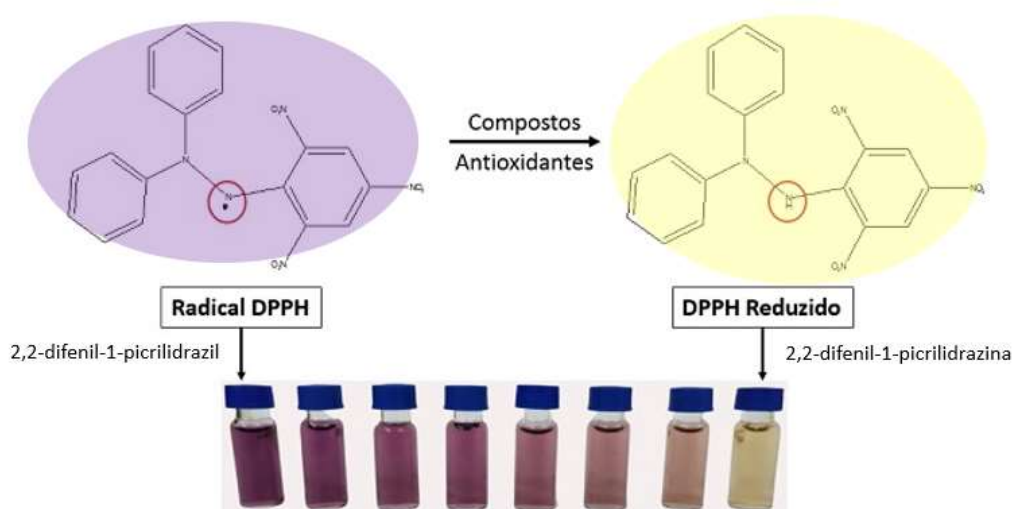
4.8.2. Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH $\bullet$)

A atividade antioxidante é determinada através da capacidade do 2-AF em sequestrar o radical estável de nitrogênio orgânico o 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH $\bullet$) (Figura 4) (BRAND-WILLIAMS, 1995). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH $\bullet$ (3 mL, 4×10^{-6} mol/L) adicionada à 1 mL de 2-AF (0,25 a 5 mg/mL) ou α -tocoferol (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 $\mu\text{g/mL}$) dissolvido em metanol (SHIMADA *et al.*, 1992).

As leituras das absorbâncias foram realizadas na faixa de 517nm após 30 min de reação em espectrofotômetro de microplaca com incubação a 25°C. O decaimento da absorbância das amostras (Aam) correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (Ac) resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL), que pode ser expressa através da equação:

$$\% \text{ SRL} = \frac{Ac - A_{am}}{Ac} \times 100$$

Figura 4: Sequestro de radical DPPH por compostos antioxidantes



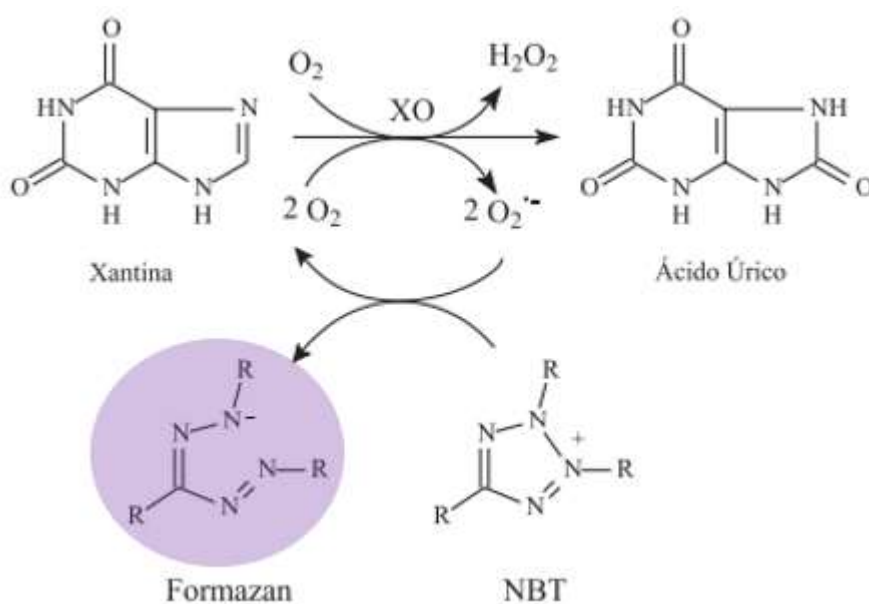
Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2022).

4.8.3. Radical Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado pelo sistema xantina oxidase – xantina e é detectado pela formação de um cromóforo com azul de nitrotetrazólio (NBT) (Figura 5). Quando a enzima superóxido dismutase (SOD) está presente, a concentração do radical ânion superóxido é reduzida, decrescendo assim a formação do cromóforo, conforme esquema abaixo (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1988). A técnica foi realizada de acordo com Melo-Silveira *et al.* (2014). Cada mistura contém 3 mL de tampão fosfato a 50 mM

(pH 7,8), metionina a 13 mM, riboflavina a 2 μ M, EDTA 100 μ M, NBT (75 μ M) e 1 mL da solução de 2-AF (0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL) ou ácido galico (0,001; 0,01 mg/mL). Após 10 minutos de iluminação com uma fonte de luz fluorescente, a produção de formazan azul foi monitorada à medida que a absorvância aumentava até 560 nm. Todo o conjunto de reações foram encerrados em uma caixa revestida com papel alumínio. Tubos idênticos com a mistura de reação foram mantidos no escuro e utilizados como o branco.

Figura 5: Sequestro de radical superóxido por compostos antioxidantes



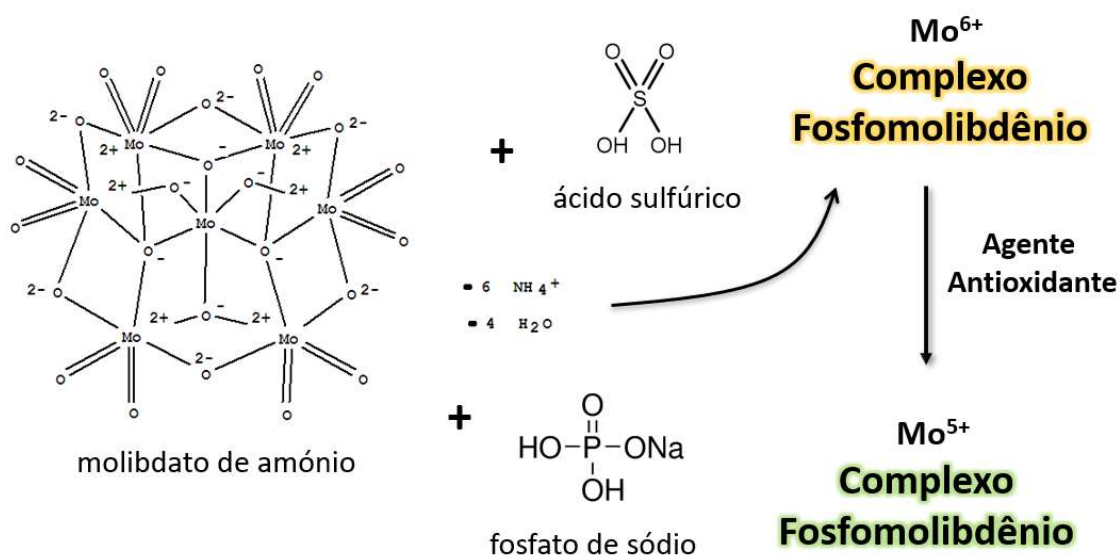
Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2022).

4.8.4. Capacidade Antioxidante Total (CAT)

Este método se baseia na redução do molibdênio (Mo^{+6}) a molibdênio (Mo^{+5}) ocorrida na presença de substâncias com capacidade antioxidante, e com subsequente formação de um complexo verde entre fosfato/ Mo^{+5} em pH ácido (PRIETO *et al.*, 1999). (Figura 6). O complexo fosfomolibdênio foi formado a partir da mistura de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.6 M, fosfato de sódio (Na_3PO_4) 28 mM e molibdato de amônio ($[NH_4]_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 4 mM. Foi adicionado em tubos o 2-AF a solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após

resfriamento até temperatura ambiente, procedeu-se a leitura a 695 nm, em um espectrofotômetro para obtenção das absorbâncias, usando-se água destilada como branco. A capacidade antioxidante foi expressa em mg de ácido ascórbico/g, descrito como equivalente de ácido ascórbico (EAA/g).

Figura 6: Redução do molibdênio (Mo^{+6}) a molibdênio (Mo^{+5})



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2022).

4.9. Eutanásia

Após o período experimental, os camundongos foram pré-anestesiados com acepromazina (4 mg/kg), e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (150 mg/kg) por via intramuscular e cloridrato de xilazina (11 mg/kg) por via intraperitoneal, em dose suficiente para eliminar o reflexo corneal (FARIA NETO; DOS SANTOS, 2008). Após a ausência do reflexo corneal, administrou-se 2 mmol/kg de cloreto de potássio e os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical (Association American Veterinary Medical – AVMA, 2013; DAMY *et al.*, 2010). Todos os procedimentos desde o

início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais.

4.10. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o método de Análise de Variância (ANOVA) “one-way” seguido do teste de Tukey ou Dunnett para comparação entre as médias. Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), sendo os valores considerados significativos, quando apresentassem um nível de significância (p) menor que 0,05.

Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism, versão 7.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA).

RESULTADOS

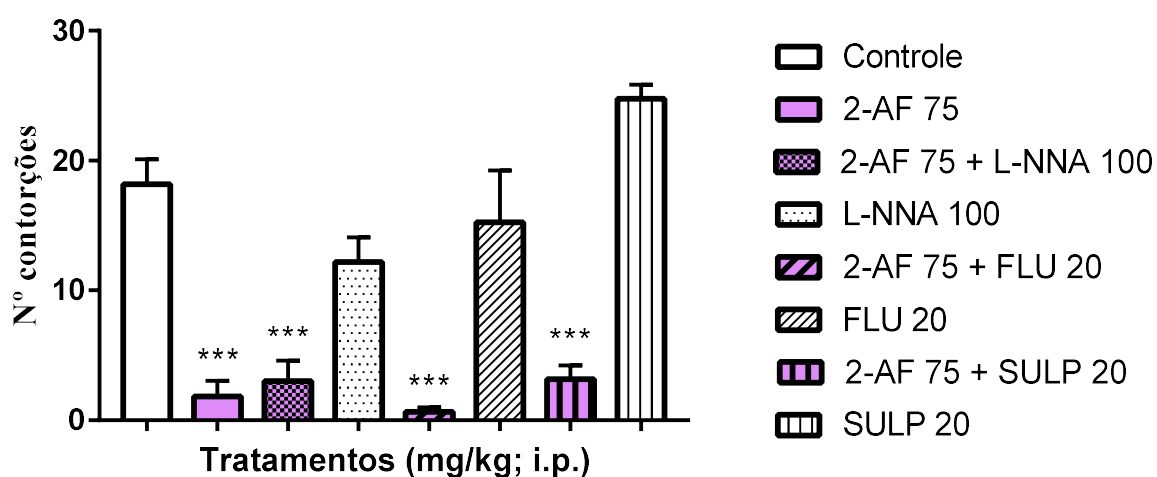
5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do mecanismo de ação antinociceptiva

5.1.1. Participação das vias Nitroxidérgica, Gabaérgica e Dopaminérgica no efeito antinociceptivo do 2-AF

Como pode ser observado na Figura 7, o 2-alilfenol (2-AF) na dose de 75 mg/kg foi capaz de reduzir ($1,83 \pm 1,2$) significativamente ($p < 0,001$) em 89,9% o número de contorções abdominais quando comparado ao grupo controle ($18,2 \pm 1,9$). As administrações prévias de L-NNA ($3 \pm 1,5$), FLU ($0,6 \pm 0,3$) e SULP ($3,1 \pm 1,0$), 15 minutos antes do 2-AF, não apresentaram qualquer diferença significativa no comportamento nociceptivo quando comparados ao grupo que foi tratado apenas com 2-AF ($1,83 \pm 1,2$).

Figura 7: Efeito da L-nitroarginina (L-NNA, 100 mg/kg, i.p.), flumazenil (FLU, 20 mg/kg, i.p.) e sulpirida (SULP, 20 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (2-AF, 75 mg/kg, i.p.) no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.



Cada coluna representa média ± e.p.m. (n=6) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Tukey) *** $p < 0,001$ vs. Controle.

5.2. Análise do 2-AF em estudos de *docking*

Na cristalografia 2YDO, o 2-AF apresentou interação com resíduos críticos de treonina (Thr) 88 e asparagina (Asn) 253 (Figuras 8 e 9) formando ligações de hidrogênio. Na cristalografia 3QAK, o 2-AF interagiu com resíduos críticos de histidina (His) 278 e serina (Ser) 277 (Figuras 10 e 11), também formando ligações de hidrogênio. Valores de energia de adenosina: MolDock -104,13 kJ/mol e Rerank -90,46 (2YDO); 2-AF: MolDock -59,18 kJ/mol e Rerank -52,83 (2YDO); UKA: MolDock -230,52 kJ/mol e Rerank -148,70 (3QAK); 2-AF: MolDock -52,25 kJ/mol e Rerank -47,47 (3QAK). O logP calculado foi 2,77 (Figura 12).

Figura 8: Interações de ligação de hidrogênio para (a) adenosina, (b) 2-AF e (c) 2-AF (sem molde) (PDB ID 2YDO). As linhas tracejadas azuis representam as interações da ligação de hidrogênio; linhas tracejadas marrons representam confrontos estéricos.

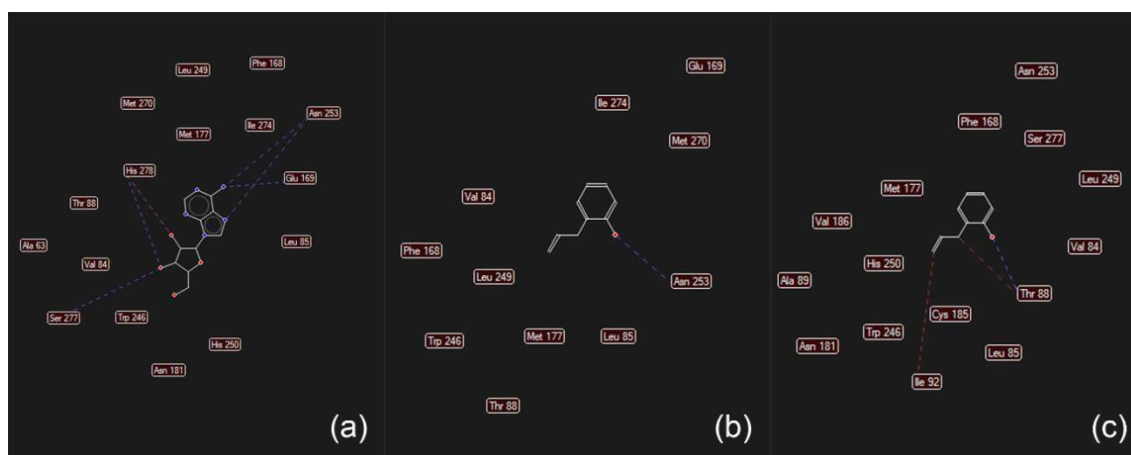


Figura 9: Melhores resultados de *docking* para adenosina (a) e 2-AF (b) no sítio ativo A2a. As linhas tracejadas azuis representam as interações da ligação de hidrogênio; linhas tracejadas marrons representam confrontos estéricos. (c) Conformações de ligação para 2-AF no sítio ativo do receptor de adenosina A2a (PDB ID 2YDO). A superfície azul representa áreas hidrofóbicas favoráveis; a superfície vermelha representa áreas hidrofílicas favoráveis.

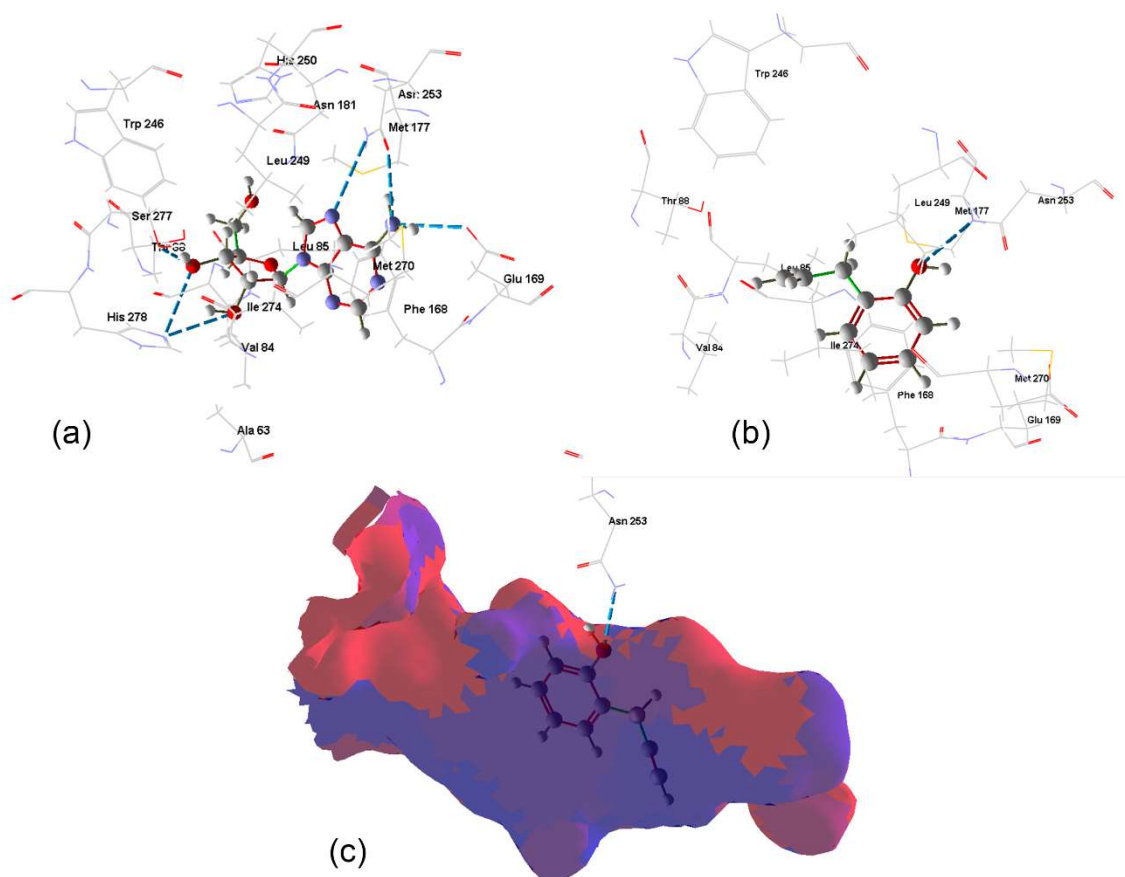


Figura 10: Interações de ligação de hidrogênio para (a) UKA, (b) 2-AF (PDB ID 3QAK). As linhas tracejadas azuis representam as interações da ligação de hidrogênio; linhas tracejadas marrons representam confrontos estéricos.

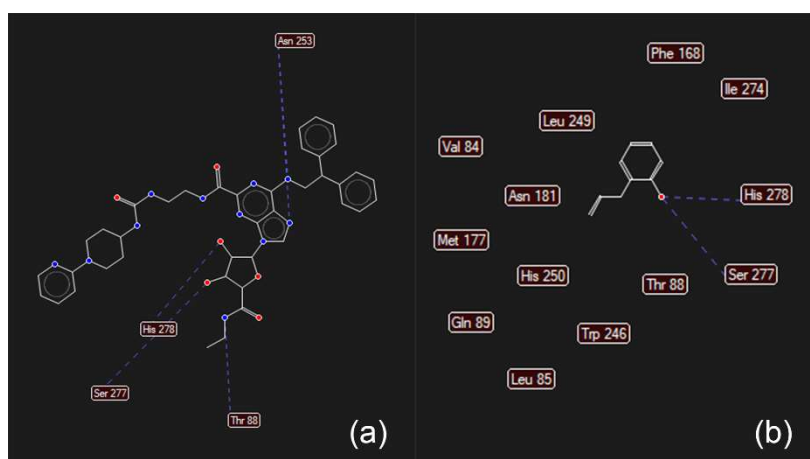


Figura 11: Melhores resultados de *docking* para UKA (a) e 2-AF (b) no sítio ativo A2a (PDB ID 3QAK). As linhas tracejadas azuis representam as interações da ligação de hidrogênio; linhas tracejadas marrons representam confrontos estéricos.

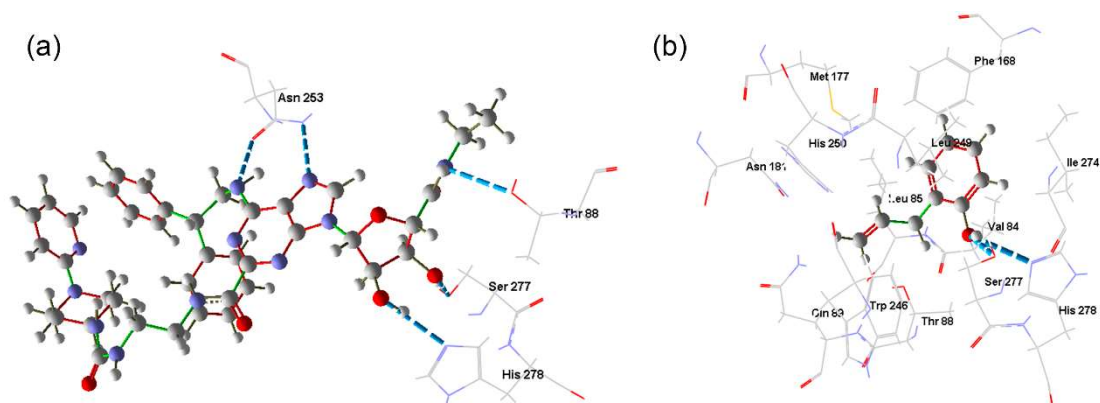
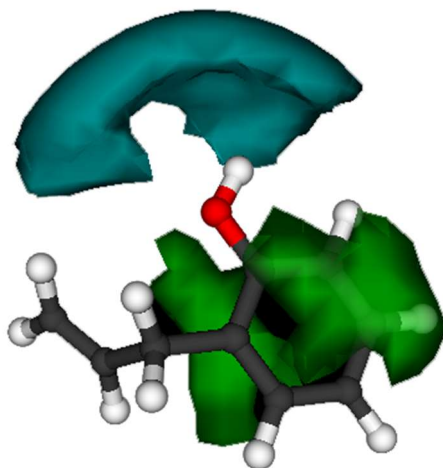


Figura 12: Campos moleculares 3D grid do 2-AF com sonda DRY. Os contornos verdes são regiões hidrofóbicas mostradas em $-1.0 \text{ kcal mol}^{-1}$; contornos azuis são regiões hidrofílicas a $-2.0 \text{ kcal mol}^{-1}$.

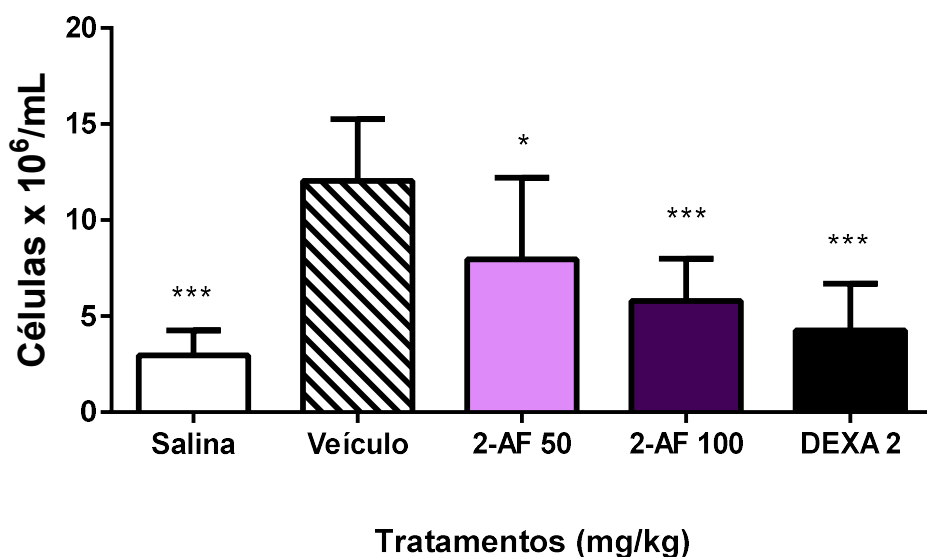


5.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória

5.3.1. Efeito do 2-AF no teste da Peritonite Induzida pela carragenina

O 2-AF administrado 30 min antes da carragenina (1%, 300 μL) diminuiu a migração de leucócitos nas doses de 50 e 100 mg/kg em 35,9% ($7,9 \pm 1,6 \times 10^6$ leucócitos/mL) e 51,75% ($5,8 \pm 0,8 \times 10^6$ leucócitos/mL), respectivamente, quando comparados ao grupo veículo ($12,0 \pm 1,1 \times 10^6$ leucócitos/mL) ($p < 0,001$). Como esperado, a dexametasona reduziu a migração leucocitária em 64,6% ($4,3 \pm 1,4 \times 10^6$ leucócitos/mL) ($p < 0,001$) como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13: Efeito do 2-alilfenol (2-AF, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e dexametasona (DEXA, 2 mg/kg, s.c.) sobre a migração leucocitária total no teste da peritonite induzida pela carragenina.

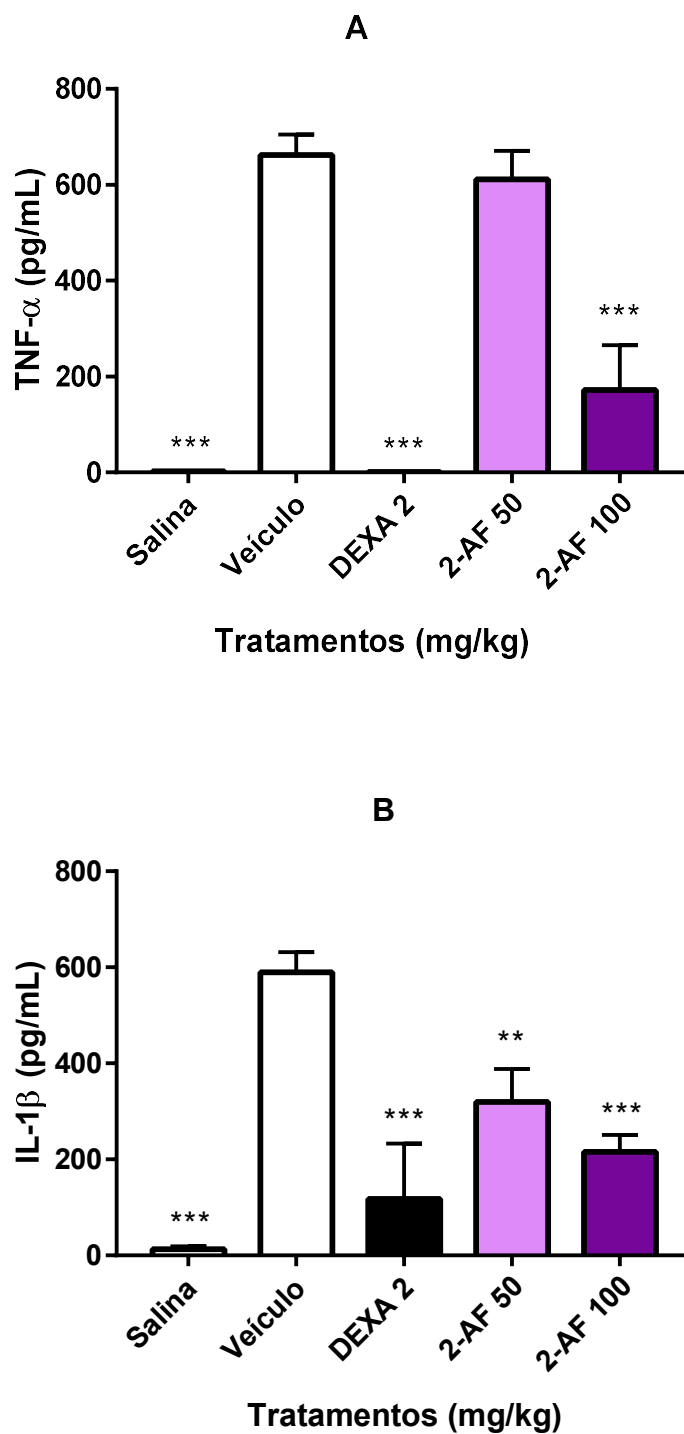


Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M (n=6). Análise estatística: one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. Veículo.

5.3.2. Efeito do 2-AF sobre as citocinas TNF- α and IL-1 β .

Quatro horas após a administração de carrageinana o 2-AF a 100 mg/kg reduziu os níveis de TNF- α em 74,0% ($172,2 \pm 93,2$) quando comparado ao grupo veículo ($662,5 \pm 42,5$) ($p < 0,001$). Assim como também reduziu os níveis de IL-1 β nas doses de 50 e 100 mg/kg em 45,8% ($319,5 \pm 69,1$) e 63,4% ($215,6 \pm 35,4$), respectivamente, quando comparado ao grupo veículo ($589,4 \pm 42,2$) ($p < 0,0001$). Dexametasona reduziu os níveis de TNF- α em 99,8% ($0,7 \pm 0,8$) ($p < 0,0001$), e IL-1 β em 79,9% ($117,9 \pm 115,0$) ($p < 0,001$) (Figura 14A e 14B).

Figura 14A e 14B: Efeito do 2-alilfenol (2-AF, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e dexametasona (DEXA, 2 mg/kg, s.c.) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β 4h após a administração de carragenina.



Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M (n=6). Análise estatística: one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs. Veículo.

5.4. Avaliação da atividade antioxidante

5.4.1. Efeito do 2-alilfenol na atividade sequestradora do radical DPPH

O presente estudo demonstra a atividade sequestradora do radical DPPH pelo 2-alilfenol, em diferentes concentrações (0,25; 0,5; 1; 2; 5 mg/mL). Para a concentração de 0,25mg/mL há uma porcentagem de atividade sequestradora de 34,3%; ocorrendo uma diminuição da atividade para concentrações maiores, não havendo diferença significativa entre elas (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade sequestradora de radical DPPH do 2-AF (0,25; 0,5; 1; 2 e 5 mg/mL).

<i>2-alilfenol (mg/mL)</i>	<i>Sequestro de radical DPPH (%)</i>
0,25	34,3 ± 8,7
0,5	19,6 ± 1,4
1	18 ± 3,57
2	17,5 ± 0,3
5	18,7 ± 0,6

Análise estatística: one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. A inibição da porcentagem de radicais DPPH foi calculada comparando o resultado obtido do 2-AF pelo do controle (não tratado com 2-AF), através da seguinte equação: atividade sequestradora (%) = $(1 - A1/A0) \times 100$, onde A0 é a absorbância do grupo controle e A1 do grupo 2-AF.

5.4.2. Efeito do 2-alilfenol na atividade sequestradora do radical hidroxila (•OH)

No teste da atividade sequestradora do radical hidroxila pelo 2-alilfenol, na concentração de 0,5 mg/mL, não há sequestro do radical hidroxila; no entanto, nas demais concentrações (1,0; 1,5 e 2 mg/mL) houve um aumento da atividade sequestradora do 2-alilfenol, sendo esta atividade muito baixa quando comparado ao padrão ácido gálico (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade sequestradora de radical hidroxila do 2-AF (0,25; 0,5; 1; 1,5 e 2 mg/mL) e do ácido gálico (0,5 mg/mL).

<i>2-alilfenol (mg/mL)</i>	<i>Sequestro de Radical OH[•] (%)</i>
0,5	-0,2 ± 0,0 ^a
1	1,7 ± 0,0 ^b
1,5	4,0 ± 0,3 ^{a, b}
2	6,1 ± 0,0 ^{a, b}
<i>Ácido Gálico (5 mg/mL)</i>	97,5 ± 3,2 ^c

Análise estatística: one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. ^{a, b, c} (p < 0,0001) vs. controle. Os resultados foram expressos em porcentagem de sequestro de radical hidroxila (%) = $\frac{[A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}]}{[A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}}]} \times 100$; Onde Acontrole: absorvância do tubo controle, Aamostra: absorvância do tubo amostra e Abranco: absorvância do tubo branco.

5.4.3. Efeito do 2-alilfenol na atividade sequestradora do radical superóxido (O₂⁻)

O 2-alifenol apresentou uma alta atividade sequestradora do radical superóxido, tanto que ele na concentração 0,1 mg/mL apresentou 88,4 ± 4,2% de sequestro. Com o aumento da concentração da amostra para 0,2 e 0,5 mg/mL foram encontrados índices de sequestro de 96,7 ± 0,2% e 96,1 ± 1,1%, respectivamente. Não houve diferença significativa do percentual de sequestro entre as concentrações testadas (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade sequestradora de radical superóxido do 2-AF (0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL) e do ácido gálico (0,5 mg/mL).

<i>2-alilfenol (mg/mL)</i>	<i>Sequestro de Radical O_2^- (%)</i>
0,1	88,4 ± 4,2
0,25	96,7 ± 0,1
0,5	96,0 ± 1,1
<i>Ácido gálico (5 mg/mL)</i>	87,2 ± 3,0

Análise estatística: one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. Os resultados foram expressos em porcentagem de sequestro de radical superóxido (%) = $([A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}] / [A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}}]) \times 100$; Onde A_{controle} : absorvância do tubo controle, A_{amostra} : absorvância do tubo amostra e A_{branco} : absorvância do tubo branco.

5.4.4. Capacidade Antioxidante Total (CAT) do 2-alilfenol

A capacidade antioxidante total foi expressa em equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/ g de 2-alilfenol). O 2-alilfenol apresentou um CAT de $319,97 \pm 0,38$ mg/g.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos pelo grupo de pesquisa da Psicofarmacologia/UFPB (ASSIS, 2016), o 2-AF apresentou um efeito antinociceptivo em modelos animais com participação do sistema glutamatérgico e adenosinérgico, sem o envolvimento direto do sistema opioide e dos canais para K⁺ ATP (ARAGÃO NETO *et al.*, 2019). Logo, o início do presente trabalho se deu pela continuidade do estudo do envolvimento de vias de sinalização no mecanismo antinociceptivo do 2-AF através do teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, um modelo simples, rápido e confiável (SHINDE, *et al.*, 1999), caracterizado por ser uma metodologia de alta sensibilidade para substâncias analgésicas centrais quanto periféricas (VAZ *et al.*, 1996; RAMEZANI; HOSSINZADEH; DANESHMAND, 2001; PERIMAL *et al.*, 2010). A administração de ácido acético na cavidade peritoneal promove ativação não seletiva de canais catiônicos e liberação de mediadores inflamatórios, causando nocicepção caracterizada por extensões das patas traseiras e contorções abdominais (KOSTER *et al.*, 1959). Como esperado, o tratamento com 2-AF reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (ASSIS *et al.*, 2016).

A investigação dos mecanismos de ação de psicofármacos, geralmente, é baseada na interação farmacológica que ocorre entre receptores e ligantes durante a transmissão neuronal. Este estudo baseia-se na utilização de antagonistas farmacológicos conhecidos, os quais, uma vez administrados previamente, bloqueiam os efeitos decorrentes da ativação do receptor específico, impedindo que a substância em estudo possa se ligar a este receptor e promover sua ação. Caso a via de sinalização bloqueada não seja um mecanismo usado pela substância-teste, o efeito não será alterado (BENEDITO *et al.*, 2013).

O primeiro sistema a ser investigado na antinocicepção induzida pelo 2-AF foi a via L-arginina-óxido nítrico, tendo em vista que essa via exerce um papel importante na modulação da nocicepção. Uma série de estudos morfológicos, fisiológicos e farmacológicos sugerem que o óxido nítrico (NO) participa do processo de nocicepção (HALEY; DICKENSON; SCHACHTER,

1992; CURY *et al.*, 2011). O mecanismo antinociceptivo do NO envolve a formação de GMP cíclico, ativação de PKG e consequentemente abertura de canais para K⁺. O NO medeia o efeito analgésico de várias drogas, incluindo opioides, dipirona e alguns agentes anti-inflamatórios. Os mecanismos pelos quais estes fármacos estimulam a produção de NO não foram ainda bem caracterizados (CURY *et al.*, 2011). O NO exerce um duplo papel no processo de nocicepção, podendo atuar como molécula nociceptiva ou antinociceptiva a depender de vários fatores, como dose utilizada, via de administração, pré ou pós-tratamento e modelo experimental utilizado (CURY *et al.*, 2011).

Os camundongos foram pré-tratados com o L-NNA, um inibidor da óxido nítrico sintase, que não foi capaz de reverter a antinocicepção produzida pelo 2-AF. Os resultados estão de acordo com outros estudos que relacionam a via do óxido nítrico com a do canal de K⁺ sensível ao ATP, uma vez que o aumento do nível de GMP cíclico provoca a abertura desses e posterior transmissão nociceptiva (ENGLISH *et al.*, 2006; VALE *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008). Esse achado corrobora com os dados de Assis (2016), no qual a glibenclamida (antagonista dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP), também não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do 2-AF. Esses resultados se complementam indicando o não envolvimento da via nitroxidérgica na antinocicepção causada pelo 2-AF.

Em seguida foi investigada a participação do sistema GABAérgico no efeito antinociceptivo do 2-AF. Estudos indicam que os receptores GABA_A estão envolvidos na nocicepção espinhal (LEE & RODGERS, 1991; GEAR *et al.*, 1997; HOLTMAN *et al.*, 2003). Uma redução no controle inibitório endógeno mediado por GABA_A no sistema nervoso central pode levar à hiperalgesia. A potencialização da inibição sináptica mediada pelo receptor GABA_A por benzodiazepínicos reverte o aumento patológico da sensibilidade à dor em estudos com animais (GOLOVENKO *et al.*, 2019). O flumazenil é um modulador alostérico do receptor GABA_A, antagonista seletivo da subunidade α -1, o que determina sua utilização para avaliação de mecanismos de drogas não só anticonvulsivantes como também analgésicas (KLOTZ & KANTO, 1988). Os camundongos foram pré-tratados o flumazenil, que não foi capaz de

reverter a antinocicepção produzida pelo 2-AF. Esse achado sugere o não envolvimento da via GABAérgica na antinocicepção causada pelo 2-alilfenol.

Por fim, a última via de sinalização estudada foi o sistema dopaminérgico, que é constituído por receptores D1, D2, D3, D4 e D5, acoplados à proteína G. Possui vários antagonistas, dentre eles a sulpirida, um antagonista de receptores do tipo D2 e o haloperidol, um antagonista não-seletivo, sendo este considerado um neuroléptico típico. A relação do sistema dopaminérgico com a modulação da nocicepção é demonstrada pela presença de receptores dopaminérgicos, principalmente do subtipo D2 e seu respectivo RNAm codificador em áreas do corno dorsal. A presença destes é mais pronunciada na lâmina I, mas também são encontrados nas lâminas de II-VI. Estudos de imunohistoquímica mostram que esses receptores estão localizados em terminais centrais de fibras aferentes primárias, estabelecendo a relação entre o sistema dopaminérgico e o controle da dor (VAN DIJKEN, *et al.*, 1996). Os camundongos foram pré-tratados com a sulpirida, que não foi capaz de reverter a antinocicepção produzida pelo 2-AF. Esse achado sugere que o efeito antinociceptivo causado pelo 2-AF não é dependente da ativação dos receptores dopaminérgicos do tipo D2.

Assis (2016), avaliou a participação do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo do 2-AF e verificou que quando houve administração prévia da cafeína, o 2-AF teve seu efeito antinociceptivo revertido em ambas as fases do teste da formalina. A partir desses resultados foi sugerido que os receptores A1, A2a e/ou A3 poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo do 2-AF. No intuito de aumentar as evidências da atuação do 2-AF na via adenosinérgica, foi realizado um estudo de *docking*. A predição de estruturas tridimensionais é de grande importância em estudos de análise e planejamento de fármacos, permitindo a utilização de metodologias computacionais, como *docking* molecular, a fim de avaliar a interação entre um ligante com uma dada proteína. O uso de técnicas computacionais apresenta-se como uma poderosa ferramenta para elucidar os aspectos envolvidos nos mecanismos dessas interações.

Usando a cristalografia do receptor de adenosina A2a, foram observadas interações do tipo ligação de hidrogênio entre 2-AF e o resíduo Asn 253. A partir da estrutura cristalográfica da adenosina (2YDO), o ligante é capaz de formar duas ligações de hidrogênio com o resíduo Asn 253, sugerindo a relevância dessa interação com o receptor. O agonista sintético (UKA), que foi projetado especificamente para uma alta seletividade pelo receptor A2a (XU *et al.*, 2011), interage através dos resíduos Asn 253, Thr 88, His 278 e Ser 277. Quando comparado com UKA, foi encontrado na cristalografia 2YDO que o 2-AF exibe interações com resíduos de Asn 253 e Thr 88, e usando a cristalografia 3QAK encontramos interações com resíduos His 278 e Ser 277.

Em termos de polaridade (LogP 2.77), o 2-AF apresenta um caráter intermediário, seu equilíbrio lipofílico/hidrofílico pode estar associado às suas interações residuais, uma vez que Asn, Thr e Ser são portadores de grupos polares e formam pontes de hidrogênio com a região hidrofílica da superfície molecular do 2-AF, representado pelo grupo hidroxila. Enquanto que a conformação do 2-AF dentro do sítio ativo indica que sua região hidrofóbica está acomodada dentro da proteína receptora.

O receptor A2a é expresso periféricamente nas células do sistema imunológico e desempenha um papel fundamental no mecanismo da inflamação, sua ativação está comumente associada à redução do processo inflamatório (LORAM *et al.*, 2007). Antonioli *et al.* (2014) relatou que mecanismo anti-inflamatório oriundo da ativação de receptores A2a, envolve diminuição de múltiplos mediadores pró-inflamatórios das células imunes. Tais receptores também são expressos em neurônios pré e pós-sinápticos e células gliais, sendo locais relevantes para a ocorrência estímulos dolorosos (MILLIGAN, ERIN & WATKINS, 2009). Loram *et al.* (2015) em vários modelos experimentais, observaram atenuação da dor neuropática usando um agonista seletivo do receptor A2a, indicando que sua ativação causa reduções na produção microglial e astrocitária de TNF- α . Corroborando esses achados, Ravani *et al.* (2017) consideram os agonistas A2a como alternativas potenciais para o tratamento da dor e da inflamação em pacientes com artrite reumatoide. Os estudos de *docking* confirmaram afinidade entre o 2-AF e o receptor A2a,

levando-nos a entender que essa interação pode estar relacionada à uma possível redução na produção de citocinas pró-inflamatórias.

A dor é um dos sinais característicos do processo inflamatório. Logo, fármacos anti-inflamatórios podem ser utilizados para supressão da dor em doenças inflamatórias. Entretanto os efeitos indesejáveis provocados por esses fármacos prejudicam o tratamento de longo prazo, como por exemplo o surgimento de lesões à mucosa gástrica que podem evoluir para úlceras. Por esse motivo, estudos que investiguem novas opção para o tratamento da dor no processo inflamatório, com uma menor gama de efeitos adversos, se faz necessário (TIELEMANS *et al.*, 2014).

Uma vez que o 2-AF reduziu a fase inflamatória do teste da formalina (ASSIS, 2016), mais estudos foram realizados para confirmar essa possível atividade anti-inflamatória, entre eles, o teste da peritonite induzida por carragenina. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado linear derivado de espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) com propriedades inflamatórias robustas e é frequentemente usada em modelos para rastrear moléculas com atividade anti-inflamatória. A administração de carragenina i.p. gera um processo inflamatório no peritônio caracterizado por migração de leucócitos e extravasamento de fluido com participação de citocinas, óxido nítrico, leucotrienos e PGE2 (LORAM *et al.*, 2007). Os anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais, apresentam eficácia no modelo da peritonite induzida por carragenina, pois reduzem a migração de leucócitos ao diminuir a produção de mediadores inflamatórios (ALMEIDA *et al.*, 1980). Os resultados sugerem que 2-AF reduziu a migração de leucócitos induzida por carragenina, da mesma forma como outros fenilpropanoides estudados, incluindo o eugenol, estragol, o-eugenol, que mostraram reduzir a migração celular estimulada por quimiotaxia (TOBINAGA *et al.*, 2012; ESTEVÃO-SILVA *et al.*, 2014; SILVA-COMAR *et al.*, 2014; FONSÊCA *et al.*, 2016).

Os processos inflamatórios do sistema nervoso central e periférico desempenham um papel importante no desenvolvimento de várias condições patológicas persistentes de dor (ZHANG & AN, 2007). A dor inflamatória é resultante da liberação de diversos mediadores inflamatórios, estando

relacionada à inflamação decorrente de lesão ou infecção tecidual. Tais mediadores são capazes reduzir o limiar de ativação dos nociceptores, causando alodínia ou hiperalgesia (WOOLF *et al.*, 2004). Vários mediadores podem desencadear a dor inflamatória, entre eles, podemos citar as citocinas, prostaglandinas, fator de crescimento neuronal (NGF) e a bradicinina (COLLINS, 1999; SCHOLZ & WOOLF, 2002). As citocinas são moléculas sinalizadoras do sistema imunológico classificadas como pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Estudos relatam o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias em processos patológicos de dor, incluindo TNF- α e IL-1 β , que são encontradas em níveis elevados em modelos animais de dor neuropática. A redução de tais citocinas, tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos, demonstra uma redução na sensação dolorosa (AZAB *et al.*, 2016; HUNG *et al.*, 2017).

Segundo Moradi *et al.* (2014), o anetol possui um potente efeito inibitório na periodontite através da supressão de citocinas pró-inflamatórias, podendo esse fenilpropanoide ser uma nova estratégia terapêutica para doenças inflamatórias crônicas. O 2-AF diminuiu os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , corroborando este resultado com o de outros fenilpropanoides (ANDRADE *et al.*, 2014) como por exemplo o cinamaldeído (CHAO *et al.*, 2008; HO; CHANG; CHANG, 2013), o metileugenol (CHOI *et al.*, 2010), os fenilpropanoides do gengibre (NIEVERGELT *et al.*, 2011) e o orto-eugenol (FONSÊCA *et al.*, 2016) que também reduziram os níveis de TNF- α e IL-1 β , logo, podemos afirmar que esta redução foi essencial para o efeito anti-inflamatório provocado pelo 2-AF.

Em modelos de dor inflamatório realizados em animais foi possível verificar que o α -asarone (KIM *et al.*, 2015), isoeugenol (PARK *et al.*, 2007), anetol (PONTE *et al.*, 2012; RITTER *et al.*, 2013) e o orto-eugenol (FONSÊCA *et al.*, 2016), promoveram efeito anti-inflamatório ao reduzir a expressão e/ou inibir a atividade do NF- κ B, que é um fator de transcrição capaz de induzir a ativação de genes responsáveis pela produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão responsáveis pela imunidade inata e adaptativa (GAMBLE *et al.*, 2012). Tais resultados reforçam a hipótese de que

possivelmente o 2-AF, assim como outros fenilpropanoides, pode estar reduzindo os níveis de TNF- α e IL-1 β por meio da redução da expressão ou inibição da atividade de NF- κ B. Para tanto, estudos complementares, devem ser realizados para confirmação desse envolvimento.

Taylor *et al.* (1983) demonstraram que as espécies reativas de oxigênio são extremamente importantes na regulação da dor e inflamação, participando da liberação de ácido araquidônico e subsequente formação de prostaglandinas. Podemos afirmar também que as EROs/ERNs estão também associadas com o desenvolvimento de diferentes tipos de dor, incluindo dor neuropática e inflamatória (SALVEMINI *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2007). As substâncias capazes de sequestrar os radicais livres inibem todos esses efeitos. Estudos mostraram que antioxidantes, como a vitamina E, são muito eficientes em aliviar a hiperalgesia mecânica em ratos, num modelo de dor neuropática (KIM *et al.*, 2004; YOWTAK *et al.*, 2011). Levando isso em consideração, estudos envolvendo o extrato de *Ginkgo biloba* demonstraram sua eficácia na redução da dor e inflamação, agindo como um sequestrador de radicais livres contra espécies reativas de oxigênio envolvidas em processos inflamatórios (HIBATALLAH *et al.*, 1999).

O estresse oxidativo ocorre devido uma desregulação entre o equilíbrio antioxidante e oxidante, em favor do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, levando a processos relacionados à inflamação (ANANTHI *et al.*, 2010). A atividade antioxidante do 2-alilfenol foi determinada pelos testes da capacidade antioxidante total, atividade sequestradora de DPPH, teste da atividade sequestradora do radical hidroxila, teste da atividade sequestradora de ânion superóxido.

O teste da capacidade antioxidante total permite determinar a capacidade antioxidante de compostos naturais (COSTA *et al.*, 2011) e indica um estresse oxidativo ou um possível aumento da probabilidade deste estresse acontecer (CAMARA *et al.*, 2011). O 2-alilfenol apresentou uma alta capacidade antioxidante total, justificando a execução de metodologias diferentes para determinar a atividade antioxidante desta substância.

O teste do DPPH é amplamente aceito como ferramenta para avaliar atividade antiradicalar de antioxidantes que é extremamente importante devido os efeitos maléficos dos radicais livres em membranas biológicas (ANTIA *et al.*, 2015). No entanto, o ensaio de sequestro de radicais ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico)) também pode ser uma opção quando se trata de amostras contendo compostos antioxidantes hidrofílicos, lipofílicos e altamente pigmentados (MENGHINI *et al.*, 2018).

No presente estudo, a atividade sequestradora do radical DPPH ocorre em todas as concentrações testadas, chegando a um máximo de 34,3% a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valor superior ao apresentado pelo cardanol, e que na mesma concentração também foi capaz de sequestrar 15,3% do radical DPPH (MOODLEY *et al.*, 2014). Oliveira *et al.* (2011) relataram que o cardanol, (apresentando uma concentração inibitória de 50% (IC_{50}) de 3,22 $\mu\text{g/mL}$) foi muito ativo no teste DPPH e destacaram seu potencial antioxidante quando comparado com os outros constituintes líquidos testados em cascas de castanha de caju. Embora o 2-AF tenha demonstrado atividade sequestrante do radical DPPH, ele foi muito mais discreto dentro de seus parâmetros de comparação.

O teste da inibição do radical hidroxila foi realizado pelo sistema Fenton que é um gerador da reação do íon ferroso e peróxido de hidrogênio (ZHANG *et al.*, 2010). O radical hidroxila é um dos mais reativos, e possui a capacidade de destruir quase todas as moléculas da célula (BAJPAI *et al.*, 2017). O 2-AF inibiu a formação dos radicais hidroxilas de maneira concentração dependente nas últimas três concentrações testadas, alcançando o máximo de 6,15% de inibição. Os fenilpropanoides podem ser usados em ferimentos na pele devido a sua capacidade sequestradoras de radicais $\text{OH}^{\cdot}$ produzidos pelos raios UV (HIBATALLAH *et al.*, 1999). Entretanto os resultados obtidos neste teste indicaram que o 2-AF apresentou pouca capacidade de sequestro de radicais hidroxila, e que, portanto, o mesmo não apresenta atividade antioxidante satisfatória para este tipo de radical livre.

Os radicais superóxido são produzidos normalmente nas células e exercem uma função catalisadora para a formação de várias outras espécies

de radicais. Devido à influência direta do radical superóxido com várias doenças, a sua inibição é muito importante (BASAK & CANDAN, 2013). O 2-AF apresentou uma expressiva porcentagem de inibição do radical superóxido em todas as concentrações testadas, obtendo um valor máximo de 96,73%, a 250 µg/mL. Um estudo semelhante envolvendo o óleo essencial de *Ginkgo biloba*, por exemplo, observou a inibição desse radical superóxido em 72,24% (BAJPAI *et al.*, 2017).

O ânion superóxido é uma ERO liberada por macrófagos e neutrófilos, responsável por ativar e sensibilizar neurônios nociceptivos, amplificando a experiência da dor (CUNHA *et al.*, 2005). Foi no teste de sequestro do radical superóxido que o 2-AF apresentou o melhor desempenho, atingindo altos percentuais de inibição em todas as concentrações testadas. Os dados tornam-se relevantes ao se examinar o potencial antioxidante em geral, uma vez que o radical superóxido, é capaz de gerar outros tipos de radicais livres e agentes oxidantes (FNDK *et al.*, 2011). O sequestro desta ERO corrobora os resultados observados nos testes anteriores e está potencialmente relacionado com o efeito antinociceptivo do 2-AF.

Por fim, este conjunto de dados sugere que o 2-AF apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória nos em modelos de nocicepção química e inflamação em camundongos, sendo proposto o envolvimento *in silico* dos receptores A2a-adenosinérgicos assim como a redução da migração leucocitária pela diminuição dos níveis de TNF- α e IL-1 β . Além disso o 2-AF apresentou uma alta capacidade antioxidante total, sendo capaz de sequestrar o radical superóxido, demonstrando que sua atividade antioxidante pode estar auxiliando no efeito anti-inflamatório e antinociceptivo. Diante desses resultados, torna-se evidente o potencial clínico do 2-AF para o tratamento da dor e inflamação.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que o 2-alilfenol:

- Possui um mecanismo de ação antinociceptivo que não envolve as vias GABAérgica, dopaminérgica e nitroxiérgica.
- Possui interações com resíduos críticos presentes no sítio ativo do receptor de adenosina A2a, sugerindo ação agonista para este subtipo de receptor.
- Diminuiu a migração de leucócitos no modelo da peritonite induzida por carragenina a partir da redução das citocinas TNF- α e IL-1 β , sugerindo sua ação anti-inflamatória.
- Apresentou uma alta capacidade antioxidante total sendo capaz de sequestrar o radical superóxido.

PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

Baseando-se nos resultados e conclusões, há várias perspectivas para a realização de estudos mais aprofundados a fim de melhor descrever o mecanismo de ação do 2-alilfenol. Dessa forma, são propostas as seguintes perspectivas para a continuação dos estudos:

- ✓ Iniciar a realização de estudos de toxicidade aguda, subcrônica e crônica do 2-alilfenol;
- ✓ Investigar a participação da via de sinalização da MAPK e NF- κ B, elucidando a relação desta via no efeito do 2-alilfenol em reduzir as citocinas TNF- α e IL1- β ;
- ✓ Analisar a participação de canais iônicos no mecanismo de ação através de técnicas eletrofisiológicas, como *single sucrose gap* e *patch-clamp*.

Levando em consideração estes aspectos, será possível realizar estudos clínicos com o 2-alilfenol, de modo que este fenilpropanoide poderá, futuramente, ser um candidato em potencial a se transformar em uma opção de medicamento analgésico, contribuindo com o arsenal clínico para o tratamento da dor atualmente disponível.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.P.; BAYER, B.M.; HORAKOVA, Z.; BEAVEN, M.A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.214, n.1, p.74-79, 1980.

ALMEIDA, Silvio de. Métodos in vivo para avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo. **BrJP**, v. 2, p. 386-389, 2019.

ANDRADE, H. H. N.; MONTEIRO, Á. B.; BRAGA, R. M.; DA CRUZ, R. M. D.; SALVADORI, M. G. D. S. S.; SCOTTI, M. T.; DE ALMEIDA, R. N. Anxiolytic and antinociceptive-like effects of cinnamic alcohol by possible GABAergic pathway modulation: In vivo and in silico studies. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51372-51389, 2020.

ANDRADE, Luciana Nalone *et al.* A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1459-1480, 2014.

AKDEMIR, FN.; GÜLÇİN, İ.; KARAGÖZ, B.; SOSLU, R.; ALWASEL, S. H. A comparative study on the antioxidant effects of hesperidin and ellagic acid against skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. sup4, p. 114-118, 2016.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION – AVMA. **Guidelines on Euthanasia**: 2013 edition, 2013.

ANANTHI, S., RAGHAVENDRAN, H. R. B., SUNIL, A. G., GAYATHRI, V., RAMAKRISHNAN, G., VASANTHI, H. R. In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 187–192, 2010.

ANTIA, B. S.; ITA, B. N.; UDO, U. E. Nutrient Composition and In Vitro Antioxidant Properties of *Harungana madagascariensis* Stembark Extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 5, p. 609–614, 2015.

ANTONIOLI, L., CSÓKA, B., FORNAI, M., COLUCCI, R., KÓKAI, E., BLANDIZZI, C., HASKÓ, G. Adenosine and inflammation: What's new on the horizon? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1051–1068, 2014.

ARAGÃO NETO, Humberto de Carvalho et al. 2-Allylphenol reduces IL-1 β and TNF- α , promoting antinociception through adenosinergic, anti-inflammatory, and antioxidant mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T.; FERRAZ, C.; ALENCAR, S. M. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, p.209-215, 2006.

ASSIS, Davidson Barbosa. **Efeito antinociceptivo do fenilpropanoide 2-alilfenol**. 2016.

ASSIS, Davidson Barbosa *et al.* Antinociceptive activity of chemical components of essential oils that involves docking studies: a review. **Frontiers in pharmacology**, p. 777, 2020.

AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1–19, 2016.

BAJORATH, Jürgen. Integration of virtual and high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 882-894, 2002.

BAJPAI, V. K.; KIM, Y.; BAEK, K. H. Phenolic Content, Lipid Peroxidation Inhibition and Antioxidant Potential of Leaf Essential Oil of *Ginkgo biloba* in Various Scavenging Models. **National Academy Science Letters**, v. 40, n. 2, p. 95–99, 2017.

BALUNAS, Marcy J.; KINGHORN, A. Douglas. Drug discovery from medicinal plants. **Life sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BASAK, Serap Sahin; CANDAN, Ferda. Effect of *Laurus nobilis* L. essential oil and its main components on α -glucosidase and reactive oxygen species scavenging activity. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 12, n. 2, p. 367, 2013.

BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, C. **Science of pain**. Oxford, U.K: Elsevier, 2009.

BASTOS, G. N. T.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, V. M. M.; COSTA, A. M. R.; BISPO, C. I.; SILVEIRA, A. J. A.; DO NASCIMENTO, J. L. M. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 241-245, 2006.

BENEDITO, Rubens Batista. **Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e avaliação histopatológica cerebral do (S)-(-)-álcool perílico em camundongos**. 2013.

BESSION, J. M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

- BLASER, H.; DOSTERT, C.; MAK, T. W.; BRENNER, D. TNF and ROS crosstalk in inflammation. **Trends in cell biology**, v. 26, n. 4, p. 249-261, 2016.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179-194, 2003.
- BRASIL, H. H. A.; BELISÁRIO FILHO, J. F. Psicofarmacoterapia. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 22, n. SUPPL. 2, p. 42-47, 2000.
- BRIDGESTOCK, C.; RAE, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 11, p. 480-483, 1 nov. 2013.
- CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, v. 73, p. 10-16, 2006.
- CAMARA, R. B. G. *et al.*, Heterofucans from the Brown Seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with Anticoagulant and Antioxidant Activities. **Marine Drugs**, 9, 124-138, 2011.
- CARDOSO, M. G. DE M. Manual de Cuidados Paliativos ANCP Ampliado e atualizado: Classificação, fisiopatologia e avaliação da dor. **Academia Nacional de Cuidados Paliativos**, p. 1-592, 2012.
- CASTEL-BRANCO, M. M.; SANTOS, A. T.; CARVALHO, R. M.; CARAMONA, M. M.; SANTIAGO, L. M.; FERNANDEZ-LLIMOS, F. As bases farmacológicas dos cuidados farmacêuticos: o caso dos AINEs. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 2, n. 2, p. 19-27, 2013.
- CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 23; p. 816-824, 1997.
- CHACÓN, C. A. S. **Síntesis de derivados de 2-Alilfenol con potencial actividad antifuga sobre Phytophthora Cinnamomi Rands**. Universidad Andrés Bello (Chile), 2019.
- CHAINY, G. B., MANNA, S. K., CHATURVEDI, M. M., AGGARWAL, B. B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF- κ B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 2943-2950, 2000.
- CHAO, Louis Kuoping *et al.* Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 220-231, 2008.

CHOI, J., SHIN, K. M., PARK, H. J., JUNG, H. J., KIM, H. J., LEE, Y. S., LEE, K. T. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of sinapyl alcohol and its glucoside syringin. **Planta medica**, v. 70, n. 11, p. 1027-1032, 2004.

CHOI, Yoo Keum *et al.* Methyleugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression of oxidative injury and inflammation. **Free Radical Research**, v. 44, n. 8, p. 925-935, 2010.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins pathologic basis of disease**. 6th ed. Philadelphia: Saunders, p. 50-88, 1999.

CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition**, v.12, p. 274-277, 1996.

CORREIA, Daniela Ferreira Gomes da Silva. **Fatores de prognóstico para a dor persistente e incapacitante em utentes com lombalgia que recorrem aos cuidados de saúde primários**. 2021. Tese de Doutorado.

COSTA, L. S., FIDELIS, G. P., TELLES, C. B. S., DANTAS-SANTOS, N., CAMARA, R. B. G., CORDEIRO, S. L., ROCHA, H. A. O. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Heterofucans from the Seaweed *Sargassum filipendula*. **Marine Drugs**, 9, 952-966, 2011.

CRAVEIRO, Afrânio Aragão. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. **Edições UFC**, 1981.

CRUCIANI, G., CRIVORI, P., CARRUPT, P. A., TESTA, B. Molecular fields in quantitative structure–permeation relationships: the VolSurf approach. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 503, n. 1-2, p. 17-30, 2000.

CUNHA, T., VERRI, W. A., SILVA, J. S., POOLE, S., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1755–60, 2005.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V. P.; FERREIRA, S. H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 243-254. 2011.

DANIEL, A. N.; SARTORETTO, S. M.; SCHMIDT, G.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 B, p. 212–217, 2009.

DA SILVA, Morgana Duarte. **Atividade antinociceptiva e inflamatória da acupuntura no acuponto spleen 6 (SP6) em camundongos: análise dos seus mecanismos neurobiológicos**. 2013.

DAMY, S. B., CAMARGO, R. S., CHAMMAS, R., FIGUEIREDO, L. F. P. D. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.

DE SOUSA, Damião Pergentino. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2233-2252, 2011.

DEWICK, Paul M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. **John Wiley & Sons**, 2002.

DIOGO, H.; SILVA, J. O. DA. PHYSIOLOGY OF PAIN. **Revista Multidisciplinar da Saúde**, n. 2, p. 1–3, 2009.

DUDAREVA, Natalia; PICHERSKY, Eran; GERSHENZON, Jonathan. Biochemistry of plant volatiles. **Plant physiology**, v. 135, n. 4, p. 1893-1902, 2004.

ENGLISH, Mark *et al.* Antinociceptive evaluation of *Buddleja davidii* Franch flower extracts and the involvement of martynoside. **Pharmacology**, v. 1, p. 1, 2006.

FABRI, R. L., GARCIA, R. A., FLORÊNCIO, J. R., DE CASTRO CAMPOS PINTO, N., DE OLIVEIRA, L. G., AGUIAR, J. A. K., SCIO, E. Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 722-732, 2014.

FARIA NETO, H. C. C.; DOS SANTOS, B. F. Fármacos usados em animais de laboratório anestésicos e analgésicos. **Manual de utilização de animais**. FioCruz, Rio de Janeiro 20–27, 2008.

FERNANDES, E.; TOSTE, S. A.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, S. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1008-1017, 2003.

FIRMO, W. D. C. A.; DE MENEZES, V. D. J. M.; DE CASTRO PASSOS, C. E.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, 2012.

FITÓ, M.; LA TORRE, R.; COVAS, M. I. Olive oil and oxidative stress. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 1215-1224, 2007.

- FNDK, E.; CEYLAN, M.; ELMASTA, M. Isoeugenol-based novel potent antioxidants: Synthesis and reactivity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4618–4624, 2011.
- FONSÊCA, D. V., SALGADO, P. R., NETO, H. D. C. A., GOLZIO, A. M., CALDAS FILHO, M. R., MELO, C. G., ALMEIDA, R. N. Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 402-408, 2016.
- GAO, X.; KIM, H. K.; CHUNG, J. M.; CHUNG, K. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. **Pain**, v. 131, p. 262-271, 2007.
- GEAR, R. W., MIASKOWSKI, C., HELLER, P. H., PAUL, S. M., GORDON, N. C., LEVINE, J. D. Benzodiazepine mediated antagonism of opioid analgesia. **Pain**, v. 71, n. 1, p. 25-29, 1997.
- GIROUD, F.; NICOLO, T. A.; KOEPKE, S. J.; MINTEER, S. D. Understanding the mechanism of direct electrochemistry of mitochondria-modified electrodes from yeast, potato and bovine sources at carbon paper electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 110, p. 112–119, 1 nov. 2013.
- GOHLKE, Holger; KLEBE, Gerhard. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 15, p. 2644-2676, 2002.
- GOLOVENKO, M., REDER, A., ANDRONATI, S., LARIONOV, V. Evidence for the involvement of the GABAergic pathway in the anticonvulsant and antinociception activity of Propoxazepam in mice and rats. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, v. 13, n. 3, 2019.
- GONG, S., HAO, J., XIA, Y., LIU, X., LI, J. Inhibitory effect of bionic fungicide 2-allylphenol on *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.) in vitro. **Pest management science**, v. 65, n. 12, p. 1337-1343, 2009.
- GRISWOLD, D. E., MARSHALL, P. J., WEBB, E. F., GODFREY, R., NEWTON JR, J., DIMARTINO, M. J., HANNA, N. A structurally novel anti-inflammatory agent that inhibits lipoxygenase-and cyclooxygenase-mediated metabolism of arachidonic acid. **Biochemical pharmacology**, v. 36, n. 20, p. 3463-3470, 1987.
- GULÇİN, I.; ALICI, H. A.; CESUR, M. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p.281-285. 2005.

- GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology** 2020 94:3, v. 94, n. 3, p. 651–715, 16 mar. 2020.
- HACIMUFTUOGLU, A.; HANDY, C. R.; GOETTL, V. M.; LIN, C. G.; DANE, S.; STEPHENS, R. L. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 173, p. 211-216, 2006.
- HALEY, J. E.; DICKENSON, A. H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in rat. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 51-58, 1992.
- HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: **Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group**, p. 1-7, 2001.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 2, p. 1609-1623, 1992.
- HARMATHA, J.; ZÍDEK, Z.; KMONÍČKOVÁ, E.; ŠMIDRKAL, J. Immunobiological properties of selected natural and chemically modified phenylpropanoids. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 4, n. 1, p. 5, 1 mar. 2011.
- HIBATALLAH, J.; CARDUNER, C.; POELMAN, M. C. In-vivo and in-vitro assessment of the free-radical-scavenger activity of *Ginkgo* flavone glycosides at high concentration. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 51, n. 12, p. 1435–1440, 1999.
- HEBERT, P. R.; BARICE, E. J.; HENNEKENS, C. H. Treatment of Low Back Pain: The Potential Clinical and Public Health Benefits of Topical Herbal Remedies. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 20, n. 4, p. 219–220, 1 abr. 2014.
- HO, Su-Chen; CHANG, Ku-Shang; CHANG, Pei-Wen. Inhibition of neuroinflammation by cinnamon and its main components. **Food chemistry**, v. 138, n. 4, p. 2275-2282, 2013.
- HOELZL, C.; BICHLER, J.; FERK, F.; SIMIC, T.; NERSESYAN, A.; ELBLING, L.; EHRLICH, V.; CHAKRABORTY, A.; KNASMULLER, S. Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 49-64, 2005.
- HOLTMAN, J. R., JING, X., SLOAN, J. W., WALA, E. P. The effects of flumazenil on the antinociceptive actions of morphine in rats. **Receptors and Channels**, v. 9, n. 5, p. 325-328, 2003.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, Sheng-You; GRINTER, Sam Z.; ZOU, Xiaoqin. Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 40, p. 12899-12908, 2010.

HUDSPITH, M. J. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 17, n. 9, p. 425–430, 1 set. 2016.

HUNG, A. L.; LIM, M.; DOSHI, T. L. Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 17, p. 287–293, 2017.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosc**, v. 2, p. 83-91, 2001.

HUYUT, Z.; BEYDEMİR, Ş.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. **Biochemistry Research International**, v. 2017, 2017.

IMRE, G., VERESS, G., VOLFORD, A., FARKAS, Molecules from the Minkowski space: an approach to building 3D molecular structures. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 666, p. 51-59, 2003.

INOUE, M.; SATO, E. F.; NISHIKAWA, M.; PARK, A. M.; KIRA, Y.; IMADA, I.; UTSUMI, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2495-2505, 2003.

JONES, S.L. Dypirone into the nucleus raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail-flick reflex. **European Journal of Pharmacology**, v.318, p.37-40, 1996.

JONES, P. G; DUNLOP, J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 197-206, 2007.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. L. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KAPOOR, D.; SINGH, S.; KUMAR, V.; ROMERO, R.; PRASAD, R.; SINGH, J. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). **Plant Gene**, v. 19, p. 100182, 1 set. 2019.

- KASTRITIS, P. L., MOAL, I. H., HWANG, H., WENG, Z., BATES, P. A., BONVIN, A. M., JANIN, J. A structure-based benchmark for protein–protein binding affinity. **Protein Science**, v. 20, n. 3, p. 482-491, 2011.
- KATAOKA, M.; TONOOKA, K.; ANDO, T.; IMAI, K.; AIMOTO, T. Hydroxyl radical scavenging activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Free Radical Research**, v. 27, p. 419-427, 1997.
- KELLY, D. J.; AHMAD, M.; BRULL, S. J. Preemptive analgesia: physiological and pharmacological modalities. **Can J. Anaesth**, v.48, p. 1000-1010, 2001.
- KIM, H. K.; PARK, S. K.; ZHOU, J. L.; TAGLIALATELA, G.; CHUNG, K.; COGGESHALL, R. E. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 111, p. 116-124, 2004.
- KIM, G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325, 2015.
- KITCHEN, D. B., DECORNEZ, H., FURR, J. R., BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.
- KLAUMANN, Paulo Roberto; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, Thiago. **Patofisiologia da dor**. Archives of veterinary science, v. 13, n. 1, 2008.
- KLAUNIG, J. E., XU, Y., BACHOWSKI, S., JIANG, J. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. **Free radical toxicology**, p. 375-400, 1997.
- KLOTZ, Ulrich; KANTO, Jussi. Pharmacokinetics and clinical use of flumazenil (Ro 15-1788). **Clinical pharmacokinetics**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 1988.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBBER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p.412-414, 1959.
- KREUGER, M. R. O., GROOTJANS, S., BIAVATTI, M. W., VANDENABEELE, P., D'HERDE, K. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. **Anti-cancer drugs**, v. 23, n. 9, p. 883-896, 2012.
- KUNTZ, I. D., BLANEY, J. M., OATLEY, S. J., LANGRIDGE, R., FERRIN, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of molecular biology**, v. 161, n. 2, p. 269-288, 1982.

KURIAN, R., ARULMOZHI, D. K., VEERANJANEYULU, A., BODHANKAR, S. L. Effect of eugenol on animal models of nociception. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 341, 2006.

LA CAMERA, S., GOUZERH, G., DHONDT, S., HOFFMANN, L., FRITIG, B., LEGRAND, M., HEITZ, T. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 267-284, 2004.

LANGER, T.; HOFFMANN, R. D. Virtual screening an effective tool for lead structure discovery. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 7, p. 509-527, 2001.

LEBON, G., WARNE, T., EDWARDS, P. C., BENNETT, K., LANGMEAD, C. J., LESLIE, A. G., TATE, C. G. Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. **Nature**, v. 474, n. 7352, p. 521-525, 2011.

LEITE, D. O. D.; COSTA, L. R.; LOPES, C. M. U.; RODRIGUES, A. Y. F.; DA COSTA, J. G. M. Propriedades físicas de óleos essenciais: Uma ferramenta experimental no ensino de Química. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e5529108889, 8 out. 2020.

LEE, C.; RODGERS, R. J. Effects of benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil, on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. **Neuropharmacology**, v. 30, n. 12, p. 1263-1267, 1991.

LEE, I.; KIM, H. K.; KIM, J. H.; CHUNG, K.; CHUNG, J. M. The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. **Pain**, v. 133, p. 9-17, 2007.

LEE, M. H., YEON, K. Y., PARK, C. K., LI, H. Y., FANG, Z., KIM, M. S., OH, S. B. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. **Journal of dental research**, v. 84, n. 9, p. 848-851, 2005.

LEMOES, Ana Paula *et al.* Saúde do homem: os motivos da procura dos homens pelos serviços de saúde. **Rev. enferm. UFPE on line**, p. 4546-4553, 2017.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v.353, p.1607-1609, 1999.

LOESER, J. D.; TREED, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LOPES, George KB; SCHULMAN, Herbert M.; HERMES-LIMA, Marcelo. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction

by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

LORAM, L. C., FULLER, A., FICK, L. G., CARTMELL, T., POOLE, S., MITCHELL, D. Cytokine Profiles During Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Rat Muscle and Hind Paw. **Journal of Pain**, v. 8, n. 2, p. 127–136, 2007.

LORAM, L. C., TAYLOR, F. R., STRAND, K. A., HARRISON, J. A., RZASALYNN, R., SHOLAR, P., WATKINS, L. R. Intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists reversed neuropathic allodynia through protein kinase (PK)A/PKC signaling. **HHS Public Access**. p. 112–122, 2015.

MACEDO, A. B., DA SILVA CRUZ, G., DA SILVA MOREIRA, L., DE AGUIAR RODRIGUES, R., GAMA, J. R. V., DE ALMEIDA, B. R. S., DA COSTA, D. L. Uso de produtos florestais não madeireiros como fármacos em comunidades rurais. **Biota Amazonia Open Journal System**, v. 9, n. 3, p. 9–12, 2019.

MAFFEI, F. R.; CARANINI, M.; ALDINI, G.; SAIBENE, L.; MACCIOCCHI, A. Antioxidant profile of nimesulide, indomethacin, and diclofenac in phosphatidylcholine liposomes (PLC) as membrane model. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 15, p. 225–234, 1993.

MANI, S. Production of Reactive Oxygen Species and Its Implication in Human Diseases. **Free Radicals in Human Health and Disease**, p. 3–15, 1 jan. 2015.

MATES, J. M.; GOMEZ, C. P.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595-603, 1999.

McCALL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1034-1053, 1999.

MELO-SILVEIRA, R. F., FIDELIS, G. P., VIANA, R. L. S., SOEIRO, V. C., SILVA, R. A. D., MACHADO, D., OLIVEIRA ROCHA, H. A. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extract from a neglected agricultural product: corn cobs. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5360-5378, 2014.

MELOV, S. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidante interventions. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, p.1395-1400, 2002.

MENG, Z., WEI, Y., XU, D., HAO, S., HU, J. Effect of 2-allylphenol against *Botrytis cinerea* Pers., and its residue in tomato fruit. **Crop Protection**, v. 26, n. 11, p. 1711-1715, 2007.

- MENGHINI, L., LEPORINI, L., VECCHIOTTI, G., LOCATELLI, M., CARRADORI, S., FERRANTE, C., ORLANDO, G. *Crocus sativus* L. stigmas and byproducts: Qualitative fingerprint, antioxidant potentials and enzyme inhibitory activities. **Food Research International**, v. 109, n. February, p. 91–98, 2018.
- MICKALAD, A. M. L. M.; ZHENG, S. X.; DUPONT, G. P. D.; DEBY, C. M. T.; LAMY, M.; REGINSTER, J. Y. Y.; HENROTIN, Y. E. In vitro study of the antioxidante properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by chemiluminescence and electron spin ressonance (ESR). **Free Radical Research**, v. 33, p. 607-621, 2000.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, p. 1-164, 1999.
- MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathologic and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, p. 23-26, 2009.
- MILLIGAN, ERIN & WATKINS, L. Pathological and Protective Roles of Glia in Chrinic Pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 23–36, 2009.
- MOFFAT, R.; RAE, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 12, n. 1, p. 12–15, 1 jan. 2011.
- MOODLEY, R., KOORBANALLY, N. A., SHAHIDUL ISLAM, M. D., JONNALAGADDA, S. B. Structure and antioxidant activity of phenolic compounds isolated from the edible fruits and stem bark of *Harpephyllum caffrum*. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 49, n. 12, p. 938–944, 2014.
- NARAYANAN, N.; THIRUGNANASAMBANTHAM, P.; VISWANATHAN, S.; KANNAPPA REDDY, M.; VIJAYASEKARAN, V.; SUKUMAR, E. Antipyretic, antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Premna herbacea* root. **Fitoterapia**, v. 71, p. 147-153, 2000.
- NATHAN, A. T.; SINGER, M. The oxygen trail: tissue oxygenation. **British Medical Bulletin**, v. 55, p.96-108, 1999.
- NETO, H. D. C. A.; DA FONSÊCA, D. V.; BRAGA, R. M.; SCOTTI, M. T.; DO NASCIMENTO, T. W. A. B.; ASSIS, D. B.; DE ALMEIDA, R. N. 2-allylphenol reduces IL-1 β and TNF- α , promoting antinociception through adenosinergic,

anti-inflammatory, and antioxidant mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

NIEVERGELT, Andreas *et al.* Ginger phenylpropanoids inhibit IL-1 β and prostanoid secretion and disrupt arachidonate-phospholipid remodeling by targeting phospholipases A2. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 8, p. 4140-4150, 2011.

OHKUBO, T.; SHIBATA, M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. **Journal of dental research**, v. 76, n. 4, p. 848-851, 1997.

OLIVEIRA, M. S. C., DE MORAIS, S. M., MAGALHÃES, D. V., BATISTA, W. P., VIEIRA, Í. G. P., CRAVEIRO, A. A., DE LIMA, G. P. G. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, v. 117, n. 3, p. 165–170, 2011.

OLIVEIRA, M.; BARRETO, A.; JÚNIOR, L. Q.; GUIMARÃES, A. Aplicação de terpenos como agentes analgésicos: uma prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 4, p. 1292–1298, 2 dez. 2014.

OSSIPOV, M. H. The Perception and Endogenous Modulation of Pain. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–25, 2012.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 1 nov. 2010.

PANFOLI, I.; CANDIANO, G.; MALOVA, M.; DE ANGELIS, L.; CARDIELLO, V.; BUONOCORE, G.; RAMENGHI, L. A. Oxidative Stress as a Primary Risk Factor for Brain Damage in Preterm Newborns. **Frontiers in Pediatrics**, v. 0, p. 369, 2018.

PEANAL, A. T., CHESSAL, G., CARTAL, G., DELOGU, G., FABBRI, D. Eugenol, bis-eugenol and synthesized related-dimer compounds produce antinociception in the acetic acid-induced-writhing responses. **Phytochemistry**, v. 6, 2004.

PERIMAL, E. K.; AKHTAR, M. N.; MOHAMAD, A. S.; KHALID, M. H.; MING, O. H.; KHALID, S.; TATT, L. M.; KAMALDIN, M. N.; ZAKARIA, Z. A.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N.; SULAIMAN, M. R. Zerumbone-Induced Antinociception: Involvement of the Larginine-Nitric Oxide-cGMP - PKC-K⁺ATP Channel Pathways. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p. 155-162, 2010.

- PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 71-80, 2007.
- PEREIRA, J. C.; MARTINS, A. B.; ROCHA, M. C. F.; JÚNIOR, S. M. C.; FEITOSA, C. M. Espécies medicinais do Brasil com potencial anti-inflamatório ou antioxidante: Uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e10310716196, 2021.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019, Vol. 20, Page 4331, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.
- POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signaling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1163-1182, 2004.
- PONTE, E.L.; SOUSA, P.L.; ROCHA, M.V.; SOARES, P.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; LEAL-CARDOSO, J.H.; ASSREUY, A.M. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. **Pharmacological Reports**, v.64, n.4, p. 984-990, 2012.
- POSSO, I. P.; ROMANEK, R. M.; GATTO, B. E. O. Dor Aguda e Inflamação. **Bases do Ensino da Anestesiologia**. Ponto 50. P. 1120-1140. 2012. Disponível em < <http://www.anestesiologiaunb.com.br/files/doraguda.pdf>
- PRIETO, Pilar; PINEDA, Manuel; AGUILAR, Miguel. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
- QU, Tian-Li; MENG, Zhao-Li; LI, Jian-Qiang¹¹. Determination of degradation dynamics of fungicide o-allylphenol in *Rhizoctonia cerealis* by high performance liquid chromatography. **Chin. J. Anal. Chem**, v. 36, p. 637-641, 2008.
- RABÊLO, L. A.; SOUZA, V. N.; FONSECA, L. J. S.; SAMPAIO, W. O. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, p. 684-693, 2010.
- RAJA, S. N.; CARR, D. B.; COHEN, M.; FINNERUP, N. B.; FLOR, H.; GIBSON, S.; VADER, K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 1 set. 2020.
- RAMEZANI, M.; HOSSINZADEH, H.; DANESHMAND, N. Antinociceptive effect of *Elaeagnus angustifolia* fruit seeds in mice. **Fitoterapia**, v. 72, p. 255-262, 2001.

RAVANI, A., VINCENZI, F., BORTOLUZZI, A., PADOVAN, M., PASQUINI, S., GESSI, S., VARANI, K. Role and Function of A2A and A3 Adenosine Receptors in Patients with Ankylosing Spondylitis, Psoriatic Arthritis and Rheumatoid Arthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 697, 2017.

REITER, R. J.; TAN, D.; BURKHARDT, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, p. 1007-1019, 2002.

REITER, R. J.; TAN, D.; MANCHESTER, L. C.; QI, W. Biochemical Reactivity of Melatonin with Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 34, 237-256, 2001.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v.60, p.404-415, 2001.

RITTER, Alessandra MV *et al.* Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 187-197, 2013.

RUSSO, C. M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annu Rev Med**, v.49, p. 123-133, 1998.

SÁ, R. C. S.; ANDRADE, L. N.; DOS REIS BARRETO DE OLIVEIRA, R.; DE SOUSA, D. P. E. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1459–1480, 27 jan. 2014.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 0, n. AUG, p. 923, 22 ago. 2018.

SALVEMINI, D.; DOYLE, T. M.; CUZZOCREA, S. Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. **Biochemical Society transactions**, v.34, p. 965-70, 2006.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; ZWEIER, J. L.; SAMOUILOV, A.; MACARTHUR, H.; MISKO, T. P. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. **Science**, v. 286, p. 304-306, 1999.

SANDOVAL, A. C.; FERNANDES, D. R.; SILVA, E. A. D.; TERRA JÚNIOR, A. T. O uso indiscriminado dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 8, n. 3, p. 165–176, 2017.

- SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant growth regulation**, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.
- SANTOS, Camila Carolina de Menezes Patrício. **Atividade antinociceptiva e antioxidante do fitol em modelos in vivo e in vitro**. 2011.
- SANTOS, Ubirajara Duarte dos. **Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido rosmarínico**. 2013.
- SARMENTO-NETO, J. *et al.* Analgesic Potential of Essential Oils. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 20, 23 dez. 2015.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**. v. 5, p. 1062-1067, 2002.
- SCHWARTZ, E. S.; KIM, H. Y.; WANG, J.; LEE, I.; KLANN, E.; Chung, J. M.; CHUNG, K. Persistent Pain Is Dependent on Spinal Mitochondrial Antioxidant Levels. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 159-168, 2009.
- SCHREINER, M.; MEWIS, I.; HUYSKENS-KEIL, S.; JANSEN, M. A. K.; ZRENNER, R.; WINKLER, J. B.; KRUMBEIN, A. UV-B-induced secondary plant metabolites-potential benefits for plant and human health. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 3, p. 229-240, 2012.
- SCHWARTZ, E. S.; LEE, I.; CHUNG, K.; CHUNG, J. M. Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. **Pain**, v. 138, p. 514–524, 2008.
- SHIMADA, K., FUJIKAWA, K., YAHARA, K., NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 40, n. 6, p. 945-948, 1992.
- SHINDE, U. A.; PHADKE, A. S.; NAIR, A. M.; MUNGANTIWAR, A. A. DIKSHIT, V. J.; SARAF, M. N. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 21-27, 1999.
- SILVA, J. C.; LIMA-SARAIVA, S. R. G.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G. D.; ALMEIDA, J. R. G. S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 18-23, 2013.
- SNEDDON, L. U. Comparative physiology of nociception and pain. **Physiology**, v. 33, n. 1, p. 63–73, 2018.

SNEDDON, L. U. Evolution of nociception and pain: evidence from fish models. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 374, n. 1785, 11 nov. 2019.

SOARES, J. C.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; MASSARIOLI, A. P.; DA SILVA, C. F.; NANI, B. D.; DE ALENCAR, S. M. Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity. **Food Chemistry**, v. 281, p. 178–188, 30 maio 2019.

SONAM, K.; BINDU, P. S.; BHARATH, M. S.; GOVINDARAJ, P.; GAYATHRI, N.; ARVINDA, H. R.; TALY, A. B. Mitochondrial oxidative phosphorylation disorders in children: Phenotypic, genotypic and biochemical correlations in 85 patients from South India. **Mitochondrion**, v. 32, p. 42–49, 1 jan. 2017.

SONG, P.; RISKS, M. Roles of reactive oxygen species in physiology and pathology. **Atherosclerosis: Risks, mechanisms, and therapies**, p. 379-392, 2015.

SOUTHOM, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine II. Involvement in human disease (Review). **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, p. 390–408, 1998.

TAYLOR, L.; MENCONI, M. J.; POLGAR, P. The participation of hydroperoxides and oxygen radicals in the control of prostaglandin synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 11, p. 6855–6857, 1983.

THOMSEN, René; CHRISTENSEN, Mikael H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

TIELEMANS, M.M.; VAN ROSSUM, L.G.; EIKENDAL, T.; FOCKS, J.J.; LAHEIJ, R.J.; JANSEN, J.B.; VAN OIJEN, M.G. Gastrointestinal symptoms in NSAID users in an 'average risk population': results of a large population-based study in randomly selected Dutch inhabitants. **International Journal of Clinical Practice**, v.68, n.4, p.512-519, 2014.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. (eds). **The Pharmacology of pain**. Springer, v. 130/I, p. 1-20, 1997.

TOBINAGA, S., HASHIMOTO, M., UTSUNOMIYA, I., TAGUCHI, K., NAKAMURA, M., TSUNEMATSU, T. Chronic Administration of Cardanol (Ginkgol) Extracted from Ginkgo biloba Leaves and Cashew Nutshell Liquid Improves Working Memory-Related Learning in Rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 1, p. 127–129, 2012.

- TORRES, P. H.; SODERO, A. C.; JOFILY, P.; SILVA-JR, F. P. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, Vol. 20, Page 4574, v. 20, n. 18, p. 4574, 15 set. 2019.
- TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, p. 853-859, 2002.
- TROUVIN, A. P.; PERROT, S. New concepts of pain. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 3, p. 101415, 1 jun. 2019.
- US, M. R., Zin, T., ABDURRAZAK, M., AHMAD, B. A. Chemistry and pharmacology of syringin, a novel bioglycoside: A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 3, p. 20-25, 2015.
- VALE, M. L. *et al.* Role of NO/cGMP/KATP pathway in antinociceptive effect of sildenafil in zymosan writhing response in mice. **Inflammation Research**, v. 56, n. 2, p. 83-88, 2007.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 1 jan. 2007.
- VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37-56, 2004.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.
- VAN DIJKEN, H.; DIJK, J.; VOOM, P.; HOLSTEGE, J.C. Localization of dopamine D2 receptor in rat spinal cord identified with immunocytochemistry and in situ hybridization. **European Journal of Neuroscience**. v. 8, p. 621-628, 1996.
- VANEGAS, H.; SCHAILBE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev**, v. 46, p. 295-309, 2004.
- VASCONCELOS, F. H.; ARAÚJO, G. C. DE. Prevalência de dor crônica no Brasil: estudo descritivo. **BrJP**, v. 1, n. 2, p. 176–179, 2018.

- VAZ, Z. R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylene derivative on chemical and thermal models of nociceptive in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304-312, 1996.
- VOGT, Thomas. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular plant**, v. 3, n. 1, p. 2-20, 2010.
- WANG, Jun *et al.* Involvement of the nitric oxide–cyclic GMP–protein kinase G–K⁺ channel pathway in the antihyperalgesic effects of bovine lactoferrin in a model of neuropathic pain. **Brain research**, v. 1209, p. 1-7, 2008.
- WANG, Renxiao; LU, Yipin; WANG, Shaomeng. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 12, p. 2287-2303, 2003.
- WANG, Z. Q.; PORRECA, F.; CUZZOCREA, S.; GALEN, K.; LIGHTFOOT, R.; MASINI, E. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, p. 869-878, 2004.
- WITZUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **The Lancet**. v. 344, p.793-795, 1994.
- WHITE, Fletcher A.; BHANGOO, Sonia K.; MILLER, Richard J. Chemokines: integrators of pain and inflammation. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 10, p. 834-844, 2005.
- WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine**. v. 140, n. 6, p. 441-451, 2004.
- WOOLF, C. J; MA, O. Nociceptors – noscious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, p. 353-364, 2007.
- XIA, Y., LI, Q. X., GONG, S., LI, Y., CAO, Y., LIU, X., LI, J. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of the new fungicide 2-allylphenol in strawberry fruits. **Food chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1178-1184, 2010.
- XU, F., WU, H., KATRITCH, V., HAN, G. W., JACOBSON, K. A., GAO, Z. G., STEVENS, R. C. Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. **Science**, v. 332, n. 6027, p. 322-327, 2011.

YANG, J. F.; YANG, C. H.; CHANG, H. W.; YANG, C. S.; WANG, S. M.; HSIEH, M. C.; CHUANG, L. Y. Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 5, p. 1254-1262, 2010.

YANO, S.; SUZUKI, Y.; YUZURIHARA, M.; KASE, Y.; TAKEDA, S.; WATANABE, S.; MIYAMOTO, K. I. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 553, n. 1–3, p. 99–103, 28 dez. 2006.

YOWTAK, J.; LEE, K. Y.; KIM, H. Y.; WANG, J.; KIM, H. K.; CHUNG, K.; CHUNG, J. M. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. **Pain**, v. 152, p. 844-852, 2011.

ZHANG, J. M.; An, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int Anesthesiol Clin.**, v. 69, n. 2, p. 482–489, 2009.

ZHANG, Y.; LI, X.; WANG, Z. Antioxidant activities of leaf extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related phenolic constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2656–2662, 2010.

ZHAOLI, Meng; XIANZHONG, Wu; QINGXIAO, Gao. The inhibitory effect of extract from *Ginkgo* on four kinds of plant pathogens. **Acta Phytopathologica Sinica** (China), 1995.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I – CERTIDÃO CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTI-NOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO 2-ALILFENOL.", protocolada sob o CEUA nº 4443051018 (ID 000459), sob a responsabilidade de **Reinaldo Nóbrega de Almeida e equipe; DAVIDSON BARBOSA ASSIS** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 07/12/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND THE MECHANISMS INVOLVED IN THE ANTI-NOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF 2-ALYLPHENOL.", utilizing 180 Heterogenics mice (180 males), protocol number CEUA 4443051018 (ID 000459), under the responsibility of **Reinaldo Nóbrega de Almeida and team; DAVIDSON BARBOSA ASSIS** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 12/07/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [12/2018](#) a [12/2021](#)

Área: [Fisiologia E Patologia](#)

Origem: [Unidade de Produção Animal IPeFarM](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade: [2 a 3 meses](#)

N: [180](#)

Linhagem: [Mus musculus - Swiss](#)

Peso: [25 a 35 g](#)

Local do experimento: [LABORATÓRIO DE PSICOFARMACOLOGIA \(PsiFarm\) da UFPB.](#)

João Pessoa, 05 de junho de 2020



Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo II – TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS EM PERIÓDICOS DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO

ASSIS, DAVIDSON BARBOSA; ARAGÃO NETO, HUMBERTO DE CARVALHO; DA FONSECA, DIOGO VILAR; DE ANDRADE, HUMBERTO HUGO NUNES; BRAGA, RENAN MARINHO; BADR, NADER; MAIA, MAYARA DOS SANTOS; CASTRO, RICARDO DIAS; SCOTTI, LUCIANA; SCOTTI, MARCUS TULLIUS; DE ALMEIDA, REINALDO NÓBREGA. Antinociceptive Activity of Chemical Components of Essential Oils That Involves Docking Studies: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 777, 2020.



SYSTEMATIC REVIEW
published: 29 May 2020
doi: 10.3389/fphar.2020.00777



Antinociceptive Activity of Chemical Components of Essential Oils That Involves Docking Studies: A Review

Davidson Barbosa Assis¹, Humberto de Carvalho Aragão Neto¹, Diogo Vilar da Fonseca¹, Humberto Hugo Nunes de Andrade¹, Renan Marinho Braga¹, Nader Badr², Mayara dos Santos Maia³, Ricardo Dias Castro¹, Luciana Scotti², Marcus Tullius Scotti^{2*} and Reinaldo Nóbrega de Almeida¹

¹ Psychopharmacology Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ² First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czechia; ³ Cheminformatics Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Rajeev K. Singh,
Shuhan University, China

Reviewed by:

Lucinda Quintans-Junior,
Federal University of Sergipe, Brazil
Himal Barakoti,
Purbanchal University, Nepal

*Correspondence:

Marcus Tullius Scotti
mtscotti@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 24 February 2020

Accepted: 11 May 2020

Published: 29 May 2020

Citation:

Assis DB, Aragão Neto HC, da Fonseca DV, de Andrade HHN, Braga RM, Badr N, Maia MS, Castro RD, Scotti L, Scotti MT and de Almeida RN (2020) Antinociceptive Activity of Chemical Components of Essential Oils That Involves Docking Studies: A Review. *Front. Pharmacol.* 11:777. doi: 10.3389/fphar.2020.00777

Introduction: Pain is considered an unpleasant sensory and emotional experience, being considered as one of the most important causes of human suffering. Computational chemistry associated with bioinformatics has stood out in the process of developing new drugs, through natural products, to manage this condition.

Objective: To analyze, through literature data, recent molecular coupling studies on the antinociceptive activity of essential oils and monoterpenes.

Data source: Systematic search of the literature considering the years of publications between 2005 and December 2019, in the electronic databases PubMed and Science Direct.

Eligibility Criteria: Were considered as criteria of 1) Biological activity: non-clinical effects of an OE and/or monoterpenes on antinociceptive activity based on animal models and *in silico* analysis, 2) studies with plant material: chemically characterized essential oils and/or their constituents isolated, 3) clinical and non-clinical studies with *in silico* analysis to assess antinociceptive activity, 4) articles published in English. Exclusion criteria were literature review, report or case series, meta-analysis, theses, dissertations, and book chapter.

Results: Of 16,006 articles, 16 articles fulfilled all the criteria. All selected studies were non-clinical. The most prominent plant families used were Asteraceae, Euphorbiaceae, Verbenaceae, Lamiaceae, and Lauraceae. Among the phytochemicals studied were α -Terpineol, 3-[5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-N'-[2-oxo-1,2-dihydro-3H-indol-3-ylidene] propene hydrazide, β -cyclodextrin complexed with citronellal, (-)- α -bisabolol, β -cyclodextrin complexed with farnesol, and p-Cymene. The softwares used for docking studies were Molegro Virtual Docker, Sybyl[®]X, Vite MDS, AutoDock Vina, Hex Protein Docking, and AutoDock 4.2 in PyRx 0.9. The molecular targets/complexes used were Nitric Oxide Synthase, COX-2, GluR2-S1S2, TRPV1, β -CD complex, CaV₁, CaV_{2.1}, CaV_{2.2}, and CaV_{2.3}, 5-HT receptor, delta receptor, kappa receptor, and MU (μ)

ARAGÃO NETO, HUMBERTO DE CARVALHO; DA FONSÊCA, DIOGO VILAR; BRAGA, RENAN MARINHO; SCOTTI, MARCUS TULLIUS ; DO NASCIMENTO, TEREZINHA WEYNE ARAÚJO BORGES; ASSIS, DAVIDSON BARBOSA; RODRIGUES-MASCARENHAS, SANDRA; SILVA, LUIZ HENRIQUE AGRA CAVALCANTE; GALVÃO, JOSÉ GUILHERME FERREIRA MARQUES; ROCHA, HUGO ALEXANDRE OLIVEIRA ; VIDAL, ARTHUR ANTUNES JACOME; FILHO, JOSÉ MARIA BARBOSA; DE ALMEIDA, REINALDO NÓBREGA. 2-Allylphenol Reduces IL-1 β and TNF- α , Promoting Antinociception through Adenosinergic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, p. 1-14, 2019.

Research Article

2-Allylphenol Reduces IL-1 β and TNF- α , Promoting Antinociception through Adenosinergic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Mechanisms

Humberto de Carvalho Aragão Neto ¹, Diogo Vilar da Fonsêca,¹ Renan Marinho Braga,¹ Marcus Tullius Scotti ¹, Terezinha Weyne Araújo Borges do Nascimento,¹ Davidson Barbosa Assis,¹ Sandra Rodrigues-Mascarenhas ¹, Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva ¹, José Guilherme Ferreira Marques Galvão,¹ Hugo Alexandre Oliveira Rocha ², Arthur Antunes Jacome Vidal,² José Maria Barbosa Filho ¹ and Reinaldo Nóbrega de Almeida ¹

¹ Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-085, Brazil

² Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal 59072-970, Brazil

Correspondence should be addressed to Reinaldo Nóbrega de Almeida; reinaldown@uol.com.br

Received 27 June 2018; Revised 6 November 2018; Accepted 15 January 2019; Published 31 March 2019

Academic Editor: David Nieman

Copyright © 2019 Humberto de Carvalho Aragão Neto et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2-Allylphenol (2-AP) is a synthetic phenylpropanoid, structurally related to cardanol, thymol, and ortho-eugenol. Phenylpropanoids are described in the literature as being capable of promoting biological activity. Due to the similarity between 2-AP and other bioactive phenylpropanoids, the present research aims at evaluating the antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory potential of 2-AP *in silico*, *in vitro*, and *in vivo*. At 30 min prior to the start of *in vivo* pharmacological testing, administration of 2-AP (25, 50, 75, and 100 mg/kg i.p.), morphine (6 mg/kg i.p.), dexamethasone (2 mg/kg s.c.), or vehicle alone was performed. In the acetic acid-induced abdominal writhing test, pretreatment with 2-AP significantly reduced the number of abdominal writhes, as well as decreased licking times in the glutamate and formalin tests. Investigation of the mechanism of action using the formalin model led to the conclusion that the opioid system does not participate in its activity. However, the adenosinergic system is involved. In the peritonitis tests, 2-AP inhibited leukocyte migration and reduced releases of proinflammatory mediators TNF- α and IL-1 β . *In vitro* antioxidant assays demonstrated that 2-AP presents significant ability to sequester superoxide radicals. *In silico* docking studies confirmed interaction between 2-AP and the adenosine A2a receptor through hydrogen bonds with the critical asparagine 253 residues present in the active site. Investigation of 2-AP demonstrated its nociception inhibition and ability to reduce reactive oxygen species. Its interaction with A2a receptors may well be related to proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β reduction activity, corroborating its antinociceptive effect.

1. Introduction

Nociception is the transmission of signals captured by free nerve endings in response to noxious stimuli; this stimulus is converted into electrical signals that reach the spinal cord, thalamus, and cerebral cortex [1]. Increased oxidative stress and inflammation are factors capable of amplifying pain.

The exacerbated production of inflammatory mediators, such as cytokines (TNF- α and IL-1 β), sensitizes and/or activates nociceptive neurons. This sensitization initially occurs in nociceptive neurons near injured tissue, leading to increases in pain sensation at the site [2, 3]. Inflammatory mediators induce recruitment of neutrophils responsible for producing reactive oxygen species (ROS), such as the

BRAGA, R. M.; ANDRADE, H. H. N.; ARAGAO NETO, H. C.; da CRUZ, R. M. D.; ASSIS, DAVIDSON BARBOSA; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, SANDRA; PORDEUS, L. C. M.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Lippia pedunculosa* Hayek essential oil and its β -cyclodextrin inclusion complex. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 20, p. 162-176, 2021.

Anexo III – RESUMOS COMUNICADOS EM ANAIS DE EVENTOS CIENTÍFICOS DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO

MONTEIRO, A. B.; ARAGAO NETO, H. C.; BRAGA, R. M.; ASSIS, DAVIDSON BARBOSA; SILVA, M. V.; ALMEIDA, R. N. AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO DO 2-ALILFENOL. In: XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018, São Paulo. Anais do XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018.

ARAGAO NETO, H. C.; MONTEIRO, A. B.; BRAGA, R. M.; ASSIS, D. B.; SILVA, M. V.; ALMEIDA, R. N. AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO DO 2-ALILFENOL. In: XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018, São Paulo. Anais do XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018.